



HAL
open science

Les mutations du gène TRIM37 dans le nanisme MULIBREY non finlandais

Florence Jobic

► **To cite this version:**

Florence Jobic. Les mutations du gène TRIM37 dans le nanisme MULIBREY non finlandais. Génétique humaine. 2016. dumas-01493848

HAL Id: dumas-01493848

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01493848>

Submitted on 22 Mar 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE PICARDIE JULES VERNE
FACULTE DE MEDECINE D'AMIENS

ANNEE 2016

N°2016-186

**Les mutations du gène *TRIM37* dans
le nanisme **MULIBREY** non Finlandais**

THESE DE DOCTORAT EN MEDECINE
DIPLOME D'ETAT
PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT
LE 05 DECEMBRE 2016

PAR

JOBIC FLORENCE

Née le 19 novembre 1988 à BREST (Finistère)

PRESIDENT DU JURY : Monsieur le Professeur Henri COPIN
MEMBRES DU JURY : Madame Marlène GALLET
Madame le Docteur Emilie BOUREL-PONCHEL
Madame le Docteur Rosalie CABRY-GOUBET
Madame le Docteur Michèle MATHIEU-DRAMARD
DIRECTEUR DE THESE : Monsieur le Docteur Guillaume JEDRASZAK

UNIVERSITE DE PICARDIE JULES VERNE
FACULTE DE MEDECINE D'AMIENS

ANNEE 2016

N°2016-186

**Les mutations du gène *TRIM37* dans
le nanisme **MULIBREY** non Finlandais**

THESE DE DOCTORAT EN MEDECINE
DIPLOME D'ETAT
PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT
LE 05 DECEMBRE 2016

PAR

JOBIC FLORENCE

Née le 19 novembre 1988 à BREST (Finistère)

PRESIDENT DU JURY : Monsieur le Professeur Henri COPIN
MEMBRES DU JURY : Madame Marlène GALLET
Madame le Docteur Emilie BOUREL-PONCHEL
Madame le Docteur Rosalie CABRY-GOUBET
Madame le Docteur Michèle MATHIEU-DRAMARD
DIRECTEUR DE THESE : Monsieur le Docteur Guillaume JEDRASZAK

REMERCIEMENTS

A mon Président de Jury de thèse :

Monsieur le Professeur Henri COPIN

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Histologie-Embryologie-Cytogénétique

Vice-Doyen et Assesseur du Premier Cycle des études médicales

Chef du Service de Médecine et Biologie de la Reproduction et de Cytogénétique

Pôle « Femme-Couple-Enfant »

Chevalier dans l'Ordre des Palmes Académiques

Pour l'honneur que vous me faites de présider mon jury de thèse,

Pour votre disponibilité, votre soutien tout au long de ma formation,

Veillez trouver ici l'expression de ma profonde et respectueuse reconnaissance.

Aux membres du Jury de Thèse :

Madame Marlène GALLET

Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier

Docteur en Biologie de l'os et des articulations et biomatériaux des tissus calcifiés

Pour l'honneur que vous me faites de juger ce travail,

Pour la gentillesse dont vous avez fait preuve lors de mon semestre à vos côtés,

Veillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

Madame le Docteur Emilie BOUREL-PONCHEL

Maître de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier

Exploration fonctionnelle du système nerveux

Pour l'honneur que vous me faites de juger ce travail,

Pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail,

Veillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

Madame le Docteur Rosalie CABRY-GOUBET

Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier

Histologie, Embryologie et Cytogénétique

Médecine et Biologie de la Reproduction, Cytogénétique et CECOS de Picardie

CHU Amiens Picardie, Centre de Biologie Humaine

Pour l'honneur que vous me faites de juger ce travail,

Pour l'enthousiasme que vous avez eu à l'égard de ce projet,

Veillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

Madame Le Docteur Michèle MATHIEU-DRAMARD

Praticien Hospitalier (Génétique Médicale)

Pour l'honneur que vous me faites d'accepter d'être dans ce jury de thèse,

Pour m'avoir permis de réaliser ce travail,

Pour votre disponibilité, votre aide et votre soutien tout au long de mon parcours,

Pour m'avoir fait partager votre passion pour la génétique médicale,

Veillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

Monsieur le Docteur Guillaume JEDRASZAK

Praticien Hospitalier (Génétique Médicale)

Pour avoir accepté de diriger ce travail,

Pour ta disponibilité, ta rigueur et ton investissement,

Pour avoir partagé cette épreuve avec moi et m'avoir aidé tout au long de ce travail,

Pour ton implication dans ma formation professionnelle, pour toutes les choses que tu m'as enseignées,

Tu trouveras ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

A toute l'équipe de Génétique Clinique :

Je remercie particulièrement le Docteur Gilles MORIN pour sa bienveillance envers nous, et le Docteur Bénédicte DEMEER pour son incroyable énergie au quotidien. Je vous remercie pour votre implication dans ma formation médicale et le partage de vos connaissances.

Je remercie sincèrement Calou, Colette, Emilie, Florence, Julie, Justine, Magali, Marie, Thérèse, Virginie, pour votre accueil chaleureux pendant trois semestres à vos côtés.

A toute l'équipe du Laboratoire de Cytogénétique :

A Aline pour ta gentillesse et tes précieuses explications.

A Catherine, Francis, Frédéric, Gwenola, Marie et Nicole pour votre accueil pendant mon semestre passé avec vous.

Veillez trouver ici mes plus sincères remerciements

A toute l'équipe du laboratoire de Génétique Moléculaire Médicale :

A Estelle pour ta rigueur et ton soutien.

A Catherine, Didier, Luigina et Patricia, pour votre accueil pendant six mois qui mon permis de mener à bien ce projet,

Veillez trouver ici mes plus sincères remerciements.

A toute l'équipe de Pédiatrie du CH de Compiègne, Catalina, Christelle, Guy, Sonia, Wajed, mes co-internes Adrien, Camille, Delphine, Hélène, Marie-Anne, Sabrina et toute l'équipe para médicale : Merci pour m'avoir accueilli dans votre équipe et m'avoir fait partager de bons moments.

Merci à toutes les personnes (Professeurs, Médecins, Internes, Personnel Paramédical) qui ont contribué à ma formation.

Aux patients et familles qui ont acceptés de faire partie de ce travail.

A toute ma famille, et mes amis :

A **mes grands-parents**, papy et mamie Lulu, je suis très fière d'écrire ça pour vous.

A **Thibault**, mon beau-frère et **Charlotte**, ma nièce pour les bons moments passés ensembles et ceux à venir.

A **Gaby**, pour tout ce qu'on a pu traverser ensemble, dans les meilleurs moments comme dans les plus difficiles. Plein de bonnes choses à venir j'en suis sûre.

A **Paule**, ma marraine, pour sa gentillesse et sa présence.

A **Nelly, Pascal, Alex et Nico** pour tous nos repas de famille mémorables.

A **Patricia, Gilles, Pauline et Tiphaine**, ma belle-famille formidable.

A mon amie d'enfance, **Margaux**, qui me suit depuis la maternelle.

A mes amis de Brest, **Caro, My, Maë**, on s'était dit rendez-vous dans 10 ans !

A mes amis de fac **Greg, Charles et Marine, Marco, Alex, Jonathan...**

A **Tania** avec qui j'ai partagé une bonne partie de mon internat à Amiens.

A **Lyse**, les cours de DES n'auraient pas été les même sans toi !

A **tous les internes de génétique** que j'ai rencontrés tout au long de mon internat.

Et à tous ceux que je n'ai pu citer... Merci à tous.

A **mon papa** pour m'avoir fait partager depuis toujours sa passion pour la médecine et pour m'avoir soutenu toutes ces années.

A **ma maman** pour son amour et son soutien durant ces longues années d'études.

A **mes sœurs, Christelle**, pour m'avoir encouragé et suivi depuis le début, et **Mathilde**, pour avoir toujours été présente pour moi, tu vas devenir une pro en génétique !

A **ma fille Lucile**, mon petit cœur qui me rend tellement heureuse.

A **Julien**, ma moitié, pour m'avoir supporté et accompagné au quotidien tout au long de ce parcours. Merci pour tout.

TABLE DES MATIERES

Remerciements	3
Table des matières	11
Liste des abréviations	14
Introduction	15
Etats des connaissances	17
1) Historique	17
2) Clinique	19
a. Critères diagnostiques	19
b. Signes associés	23
3) Génétique	26
a. Gène <i>TRIM37</i>	26
b. Protéine TRIM37	26
c. Mutations	28
Matériel et méthode	30
1) Recrutement des patients	30
2) Extraction de l'ADN génomique des patients et de leurs apparentés	31
3) Séquençage du gène <i>TRIM37</i>	32
a. PCR	32
b. Séquençage des exons d'intérêt	33
c. Analyse des résultats	34
4) Recherche de grand réarrangement du gène <i>TRIM37</i> par QFM-PCR (PCR multiplex semi-quantitative amplifiant de courts fragments fluorescents)	35
a. Amplicons témoins	36
b. Protocole	36

c.	Analyse des résultats	37
5)	Confirmation des résultats obtenus par QFM-PCR : la QPCR (PCR quantitative en temps réel)	39
a.	Principe de la méthode	39
b.	Protocole	41
6)	Séquençage des points de cassure	42
a.	Protocole	42
	Résultats	43
1)	Phénotype des patients	43
a.	Patient 1	43
b.	Patient 2	44
c.	Patient 3	46
2)	Analyses moléculaires	47
a.	Bilan initial	47
b.	Séquençage complet du gène <i>TRIM37</i>	47
c.	Recherche de grand réarrangement par QFM-PCR	48
d.	Confirmation des résultats obtenus par QPCR	50
e.	Séquençage des points de cassure	52
3)	Synthèse des résultats obtenus	56
	Discussion	57
1)	Clinique	57
a.	Critères diagnostiques	57
b.	Variabilité phénotypique	58
c.	L'atteinte cardiaque : un facteur pronostic	58
d.	Diagnostic différentiel : le syndrome Silver-Russell	59
2)	Génétique	62
a.	Les mutations de <i>TRIM37</i> sont de type perte de fonction	62

b.	Les mutations de nos patients : des mutations délétères perte de fonction.....	62
c.	Les délétions intra géniques : des remaniements médiés par les séquences <i>Alu</i> ...	63
	Conclusion.....	67
	Références	69
	Annexe I : Primers.....	72
	Annexe II : Protocoles.....	73
1)	Sanger.....	73
2)	QFM-PCR	75
3)	Q PCR	76
	Annexe III : Serment d'hippocrate.....	77

LISTE DES ABBREVIATIONS

CGH : Comparative Genomic Hybridation / Hybridation génomique comparative

Ct : Cycle Threshold / Cycle seuil

DS : déviation standard

FosTeS : ForkStalling and Template Switching / interruption de la fourche de réplication et commutation de la matrice

LCR : Low Copy Repeat

NAHR : Non Allelic Homologous Recombination / Recombinaison Homologue Non-Allélique

NHEJ : Non Homologous End Joining / jonction d'extrémités non homologues

PCR : Polymerase Chain Reaction / réaction en chaîne par polymérase

QFM-PCR : Quantitative fluorescence Multiplex PCR / PCR multiplex semi-quantitative amplifiant de courts fragments fluorescents

QPCR : Quantitative Polymerase Chain Reaction / PCR quantitative en temps réel

SINE : Short INterspersed Elements

T_m : Temperature of Melting / Température de demi-dénaturation

TRIM37 : TRIPartite Motif-containing protein 37

INTRODUCTION

Le nanisme MULIBREY, acronyme de MUscle (muscle), LIver (foie), BRain (cerveau) et EYes (yeux) - OMIM 253250, est une pathologie rare d'origine génétique. La prévalence est inconnue, 135 cas ont été décrits à ce jour. Le mode de transmission est autosomique récessif, et il existe donc un risque de récurrence d'un sur quatre dans une fratrie.

Le diagnostic de nanisme MULIBREY doit être évoqué devant un retard de croissance sévère pré et postnatal, une dysmorphie faciale typique associant visage triangulaire, front proéminent, arête du nez plate et télécanthus, des anomalies radiologiques des os longs ou de la selle turcique (en forme de J), et des points jaunâtres sur la rétine. Des complications cardiaques et tumorales sont également associées à ce syndrome, celles-ci sont importantes à diagnostiquer afin d'adapter la prise en charge et le suivi de ces patients (1).

Le gène responsable du nanisme MULIBREY, *tripartite motif-containing protein 37*, est situé sur le chromosome 17, en position 17q22-q23 (2). Ce gène code la protéine TRIM37 qui appartient à la famille des protéines « Rings Finger ». Au niveau fonctionnel, quatre domaines ont été identifiés : deux motifs « doigt de zinc », un domaine « ring », et un domaine « coiled coil ». Cette protéine possède également un domaine fonctionnel TRAF (necrosis factor receptor) (3). Elle se localise principalement au niveau du peroxysoxe, possède une activité RING dépendante, une activité d'auto-ubiquitination et E3ligase (4). A ce jour, dans la littérature, 23 mutations différentes du gène *TRIM37* ont été associées au nanisme MULIBREY chez des patients non Finlandais (5). Comme les mutations finlandaises, elles sont responsables d'une perte de fonction de la protéine.

L'objectif de mon travail était d'explorer sur le plan moléculaire des patients sans origine finlandaise connu répondant aux critères cliniques du nanisme MULIBREY. Ce travail, réalisé en collaboration avec les équipes de Génétique Clinique du CHU d'Amiens, de Génétique Clinique du CHRU de Lille et de Génétique Moléculaire du CHU d'Amiens, m'a permis d'étudier 3 patients sur le plan clinique et génétique. Au niveau clinique, nos résultats soulignent l'importance d'évoquer le nanisme MULIBREY lorsque le phénotype est typique afin d'adapter le suivi des patients, du fait de la gravité des complications (cardiaques et tumorales) et de l'intérêt de l'étude familiale pour orienter les stratégies d'analyses et adapter

le conseil génétique. Au niveau moléculaire, nous avons analysé le gène *TRIM37*, en mettant au point le séquençage Sanger et la PCR semi quantitative fluorescente (QFM-PCR). Ces explorations moléculaires ont permis de mettre en évidence une hétérozygotie composite pour des mutations perte de fonction chez chacun d'eux. Deux des mutations rapportées n'ont jamais été décrites dans la littérature.

ETATS DES CONNAISSANCES

1) Historique

La première description clinique du nanisme MULIBREY a été réalisée en Finlande, en 1970, par Perheentupa *et al.* à partir de l'observation de 23 patients finlandais, dont 3 paires de germains issus de parents consanguins. Elle décrit un syndrome associant un retard statural avec une atteinte musculaire, hépatique, oculaire et cérébrale. Chez ces 23 patients, le retard de croissance était évident à la naissance, on retrouvait également comme signe constant une dysmorphie faciale incluant un visage triangulaire, une hypotonie musculaire, une voix particulière, une hypertrophie du foie et des points jaunâtres rétiens (6). Initialement nommé syndrome de Perheentupa, l'association clinique fait renommer ce syndrome « MULIBREY » pour « MUScle LIver BRain EYes ».

Le nanisme MULIBREY appartient au groupe des maladies de l'héritage finlandais. En effet, il s'agit d'un ensemble de maladies génétiques dont la prévalence est particulièrement élevée en Finlande, ceci étant dû à un effet fondateur. Ainsi, l'apparition d'un allèle pathologique se répandant dans une population restreinte dont la mobilité géographique est faible et ayant peu de contact avec les autres populations abouti à une concentration de certaines maladies génétiques au sein de cette population. Le nanisme MULIBREY est un exemple parfait de ce type de maladie, avec une prévalence nettement plus élevée en Finlande que dans les autres pays du monde.

Vingt ans après les premières descriptions cliniques, à la fin des années 1990, une première étude ayant utilisé le clonage positionnel a permis de définir une région critique de 800kb sur le chromosome 17, en 17q22q23, comme étant associée au nanisme MULIBREY(7).

Puis, en 2000, le gène responsable du nanisme MULIBREY a été caractérisé. Ces travaux ont permis de mettre en évidence 4 mutations dans un gène codant une nouvelle protéine appartenant à la famille des protéines RING B BOX COILED COIL. D'abord dénommé MUL en référence au nanisme MULIBREY (2), le gène fut renommé *TRIM37* lorsque la famille des protéines TRIM a été caractérisée (8).

A l'heure actuelle, environ 140 cas de patients atteints de nanisme MULIBREY sont décrits dans le monde, avec des origines géographiques variées.

2) Clinique

a. Critères diagnostiques

En 2004, Karlberg *et al.* ont établi des critères cliniques, à partir d'une cohorte de 80 patients finlandais, permettant de poser le diagnostic de nanisme MULIBREY (1).

Les critères sont répartis en majeurs et mineurs. On retrouve dans les critères majeurs :

- Un retard de croissance supérieur à -2DS, à début prénatal, sans rattrapage en post natal. Il est présent chez 95% des patients rapportés en Finlande (1) (Fig. 1). La taille moyenne à la naissance est de -3,1 DS avec des valeurs extrêmes allant de -6,4 DS à -0,7 DS. Ce retard de taille tend à s'aggraver au cours du temps avec une perte en moyenne supérieure à 1 DS (-1DS à -3 DS). La taille moyenne au moment du diagnostic est de -4 DS (M à -7,8DS) (1) et la taille finale à l'âge adulte est en moyenne de 136 cm pour les femmes (- 5,1DS) et de 150 cm pour les hommes (-4,1 DS) (9). La prise en charge de ce retard statural par hormone de croissance a été étudiée, celle-ci permet une amélioration sur la taille pré pubère mais a seulement un faible impact sur la taille finale (+ 5cm) (9). Le rôle précis de l'axe GH-IGF1 dans le retard de croissance chez les sujets atteints de nanisme MULIBREY reste incompris.

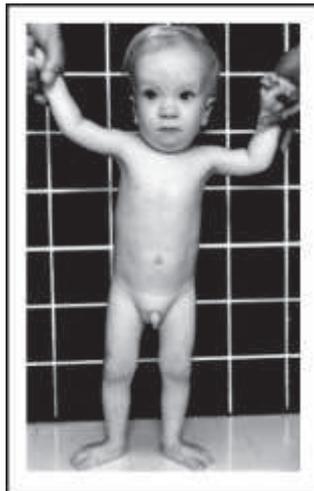


Figure 1. Morphotype d'un patient atteint de nanisme MULIBREY (1).

- Des anomalies radiologiques, avec notamment une selle turcique en J (Fig. 2), signe présent chez 89% des patients, et des os longs fins avec un cortex épaissi, signe présent chez 93% des patients (1).

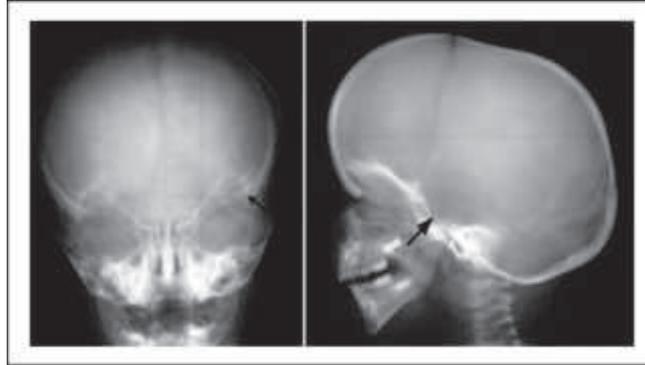


Figure 2. Anomalie radiologique : selle turcique en « J » (1).

- Une atteinte oculaire à type de points réiniens jaunâtres, présent chez 79% des patients finlandais, avec une vision peu ou pas altérée.
- Une dysmorphie faciale caractéristique, présente chez 90% des patients, incluant un visage triangulaire avec un front proéminent, une scaphocéphalie et un télécanthus (Fig. 3).



Figure 3. Dymorphie faciale du nanisme MULIBREY. 1a, b : Karlberg *et al.* (1), 2a, b, c : Lapunzina *et al.* (10), 3a, b : Hämäläinen *et al.* (11), 4 : Seemanová and Bartsch (12).

- Un antécédent familial de nanisme MULIBREY.

Les critères mineurs regroupent :

- Une voix haut perchée, retrouvée chez 96% des patients.
- Une hépatomégalie, présente chez la moitié des patients au moment du diagnostic. Il s'agit d'une atteinte congestive du foie qui serait un des premiers signes cliniques d'une atteinte cardiaque.
- Des nævi cutanés (65% des cas).

- Une dysplasie fibreuse des os longs, présente chez 15% des patients, la plupart du temps au niveau des membres inférieurs (Fig. 4).



Figure 4. Anomalies radiologiques : dysplasie fibreuse des os longs (1).

Le nanisme MULIBREY est défini sur le plan clinique par la présence de trois signes majeurs associés à un signe mineur ou par l'association de deux signes majeurs et trois signes mineurs (Fig. 5).

Table 5 Diagnostic signs and their prevalence in 85 patients with Mulibrey nanism (46 females and 39 males)
For the diagnosis, three major signs with one minor sign are required, or two major signs with three minor signs

Signs	Frequency(%)
Major signs	
Growth failure (A or B or C)	
A) small for gestational age (SGA) lacking catch up growth	95
B) height in children 2.5 SDs below population mean for age	94
C) height in adults 3.0 SDs below population mean	90
Characteristic radiological findings (A or B)	
A) slender long bones with thick cortex and narrow medullar channels	93
B) low and shallow (J-shaped) sella turcica	89
Characteristic craniofacial features	90
Scaphocephaly, triangular face, high and broad forehead, low nasal bridge and telecanthus	
Characteristic ocular findings	
Yellowish dots in retinal mid peripheral region	79
Mulibrey nanism in a sibling	17
Minor signs	
Peculiar high pitched voice	96
Hepatomegaly	70
Cutaneous naevi flammei	65
Fibrous dysplasia of long bone	25

Figure 5. Critères cliniques du nanisme MULIBREY d'après Karlberg *et al.* (1).

b. Signes associés

Atteinte cardiaque

L'atteinte cardiaque, absente des critères diagnostiques, est fréquemment associée au nanisme MULIBREY et est la principale atteinte conditionnant le pronostic de ces patients. La fréquence des atteintes cardiaques dans ce syndrome est estimée à 15% dans l'étude de Karlberg *et al.* (1) mais les auteurs précisent que cette fréquence est supérieure à 50% à l'âge adulte, mettant ainsi en évidence la pénétrance de la cardiopathie liée à l'âge. Dans une étude portant sur 49 patients, Lipsanen *et al.* rapportent une atteinte cardiaque dans 51% des cas et un âge moyen au diagnostic de 8 ans. Certaines études évoquent une fréquence plus élevée de cardiopathie chez les patients non finlandais (13,14). L'atteinte cardiaque la plus fréquente est la péricardite chronique constrictive qui le plus souvent, du fait d'une évolution rapide, nécessite une prise en charge chirurgicale précoce (15,16). D'après l'étude de Lipsanen, un retard dans la prise en charge chirurgicale chez les patients symptomatiques ne permettrait pas d'obtenir une amélioration clinique et n'a pas pu empêcher le décès par insuffisance cardiaque congestive chez 5 patients (15).

Il est nécessaire de réaliser un suivi régulier de ces patients, même après une prise en charge chirurgicale. Celle-ci étant recommandée dès lors qu'un patient est symptomatique (14).

Risque tumoral

Chez les patients atteints de nanisme MULIBREY, il est également décrit un risque tumoral accru. En effet, dès 2004, Karlberg *et al.* retrouvaient dans la cohorte de patients finlandais des tumeurs du foie chez 6 patients, ainsi que des tumeurs bénignes des ovaires chez 12 femmes post pubères (1). Plusieurs cas de tumeurs du rein, notamment des tumeurs de Wilm's, ont été décrits entre 1980 et 2006 chez des enfants suivis pour nanisme MULIBREY (11,12,17). De ce fait, en Finlande, un suivi systématique du risque tumoral a été mis en place.

En 2009, Dans son étude portant sur une cohorte de 74 patients finlandais âgés de 0,7 à 76 ans, des lésions tumorales ont été mises en évidence chez 74% des patients (18). Le plus souvent il s'agit de lésions bénignes telles que des kyste, adénome surrénalien, adénome parathyroïdien, goitre thyroïdien, cystadénome pancréatique, angiomyolipome rénal, fibrothécome ovarien et phéochromocytome. Chez 15% des patients, il s'agissait de tumeurs

malignes : tumeur de Wilm's, carcinome papillaire rénal, carcinome papillaire ou médullaire thyroïdien, carcinome ovarien et de l'endomètre, leucémie aigue lymphoblastique, histiocytome langheransien, ou tumeur carcinoïde.

Suite aux résultats de ces études, il est proposé de réaliser une surveillance par échographie abdominale régulière chez les patients atteints de nanisme MULIBREY (11).

Autres signes fréquents

- Anomalie du métabolisme : les patients atteints de nanisme MULIBREY peuvent également développer une résistance à l'insuline et un syndrome métabolique précoce. Alors que dans l'enfance les taux de glucose et d'insuline sont normaux, 90% des adultes développent un diabète de type 2 (50%) ou une intolérance au glucose (19).
- Atteinte ovarienne : les patientes atteintes de nanisme MULIBREY développent une insuffisance ovarienne prématurée, leur utérus et leurs ovaires sont atrophiés et, dans le meilleur des cas, seulement quelques follicules sont visibles à l'échographie. Le plus souvent, ces patientes sont infertiles (20).
- Atteinte testiculaire : une hypoplasie testiculaire et des anomalies du spermogramme sont également présentes chez les hommes (21).
- Développement neurologique : les patients atteints de nanisme MULIBREY n'ont pas de déficience intellectuelle. Néanmoins, un retard dans l'apprentissage de la marche et de la parole est retrouvé dans 1/3 des cas. L'âge des premiers pas et des premiers mots s'étend respectivement de 0,8 à 2,6 ans (moyenne 1,2 ans) et de 0,9 à 3,1 ans (moyenne 1,3 ans). Une hypotonie modérée est également retrouvée chez la moitié des enfants âgés de 2 ans.
- Troubles de l'oralité : près de 50% des patients atteints de nanisme MULIBREY présentent des difficultés alimentaires à la naissance, à type de vomissements, ou de retard d'introduction d'une alimentation en morceaux. Ces difficultés alimentaires disparaissent la plupart du temps dès la petite enfance (21).

L'étude de Karlberg *et al.* a rapporté la fréquence des différents signes associés au nanisme MULIBREY dans le tableau suivant (Fig. 6) :

Table 1 Problems in infancy in 85 patients with Mulibrey nanism

Feature	Frequency (%)
Neonatal problems	
Respiratory problems	31
Ventilatory assistance needed	20
Cyanosis while crying	15
Feeding difficulties	30
Nasogastric feeding tube needed	17
Suspicion of hydrocephalus	6
Suspicion of sepsis	6
Cardiac arrhythmia	1
Growth failure	96
Infections	
Upper respiratory infections >4/year	51
Pneumonia	47
Necessitating hospital care	30
Three or more pneumonias	27
Ventilatory assistance needed	25
Intubation needed	14
Middle ear infections >4/year	38
Feeding difficulties	50
Vomiting	39
Difficulties in sucking	31
Nasogastric feeding tube needed	31
Delay in switching to solid foods	24
Fatigue during eating	21
Percutaneous gastrostomy needed	6
Muscular hypotonicity	46
Suspicion of hydrocephalus	16
Hypoglycaemia	15
Congestive heart failure	11
Resuscitation during first year of life	11
Due to infection	9
Due to aspiration	1
Due to arrhythmia	1
Death during infancy	5
Due to infection	2.5
Due to congestive heart failure	2.5

Figure 6. Fréquence des différents signes associés au nanisme MULIBREY.

3) Génétique

a. Gène *TRIM37*

Le gène responsable du nanisme MULIBREY, *tripartite motif-containing protein 37* (*TRIM37* #OMIM 605073), est situé sur le chromosome 17, en 17q22-q23. Il mesure environ 800 kb et code la protéine TRIM37.

Le site d'initiation de la transcription se situe environ 246 à 373 nucléotides en amont du site d'initiation de la traduction (ATG).

La région promotrice du gène s'étend elle jusqu'à 600 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription. Cette région comprend de nombreux sites prédictifs de fixation de facteurs de transcription et de facteurs de régulation de la transcription.

Le gène *TRIM37* est à l'origine de la production de 2 transcrits différents : un transcrit d'expression ubiquitaire d'environ 4,5 kb, et un second transcrit de 3,9 kb retrouvé uniquement dans le tissu testiculaire. Ces deux transcrits codent la même protéine mais ont un codon stop et une région 3'UTR différente (22) (Fig. 7).

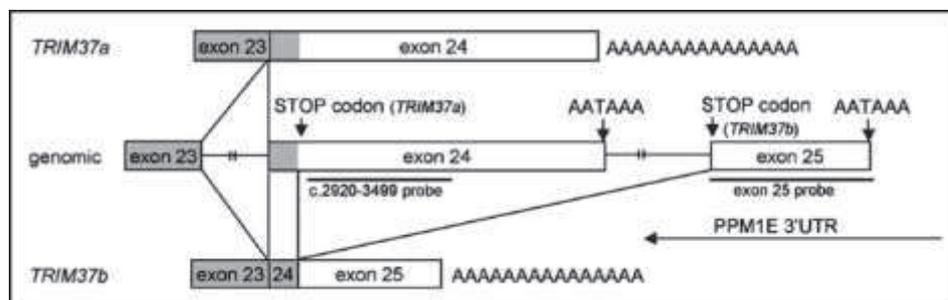


Figure 7. Région 3' des deux transcrits alternatifs de *TRIM37*.

b. Protéine TRIM37

La protéine TRIM37 est composée de 979 acides aminés et a une masse moléculaire de 108 kD.

TRIM37 appartient à la famille des Tripartite Motif Protéines. Cette famille est caractérisée par la présence d'un RING finger, un ou deux motif(s) zinc nommé(s) Bbox et une région coiled coil (8). Les domaines RING et Bbox interviennent dans les interactions

entre protéines et entre protéine-acides nucléiques (23), la région coiled coil est impliquée dans la localisation subcellulaire. Elle possède également un domaine TRAF (TNF-receptor associated factor) important dans les interactions protéine-protéine. Les protéines TRIM régulent beaucoup de fonctions cellulaires comme la prolifération cellulaire, la différenciation, l'angiogenèse et l'oncogenèse (24). L'homo-oligomérisation via la région coiled-coil semble cruciale pour la fonction des protéines TRIM (4) (Fig. 8).

La protéine TRIM37 possède également une activité E3 ligase (4), et donc interviendrait dans la dégradation protéique par le protéasome.

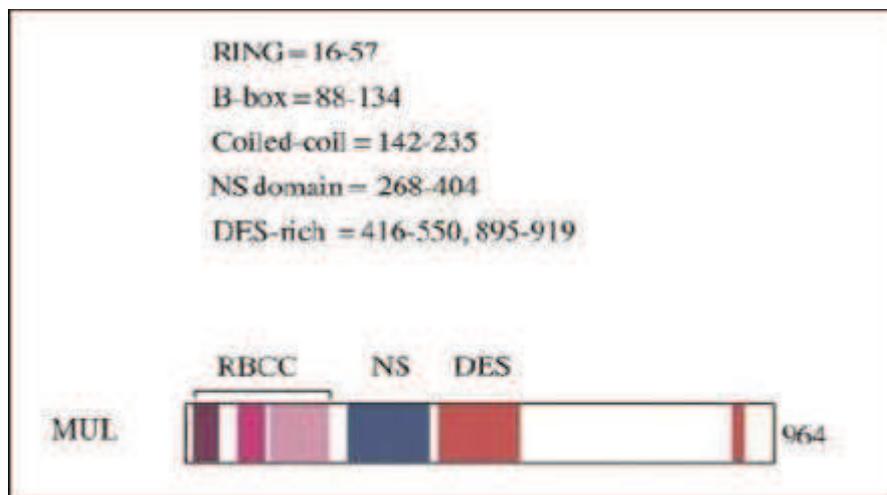


Figure 8. Schématisation des domaines fonctionnels selon Avela *et al.* (2).

La protéine TRIM37 est d'expression ubiquitaire, avec une expression intermédiaire dans le cerveau, le foie, les testicules, et l'ovaire et une faible expression dans le cœur, les poumons, les muscles squelettiques et les reins, et peu ou pas d'expression dans le pancréas et la rate (21,25). Les différents taux d'expression de la protéine dans les tissus est cohérente avec le phénotype clinique du nanisme MULIBREY.

Au niveau cellulaire, les travaux de Kallivarji *et al.*, en 2002, ont permis de déterminer sa localisation au niveau des peroxyosomes (3). En effet, la colocalisation de TRIM37 avec des marqueurs de peroxyosomes a été étudiée après double coloration par immunofluorescence (Fig. 9). L'analyse des mutations a montré que les domaines N-terminaux étaient requis pour la distribution intracellulaire peroxyosomale de la protéine.

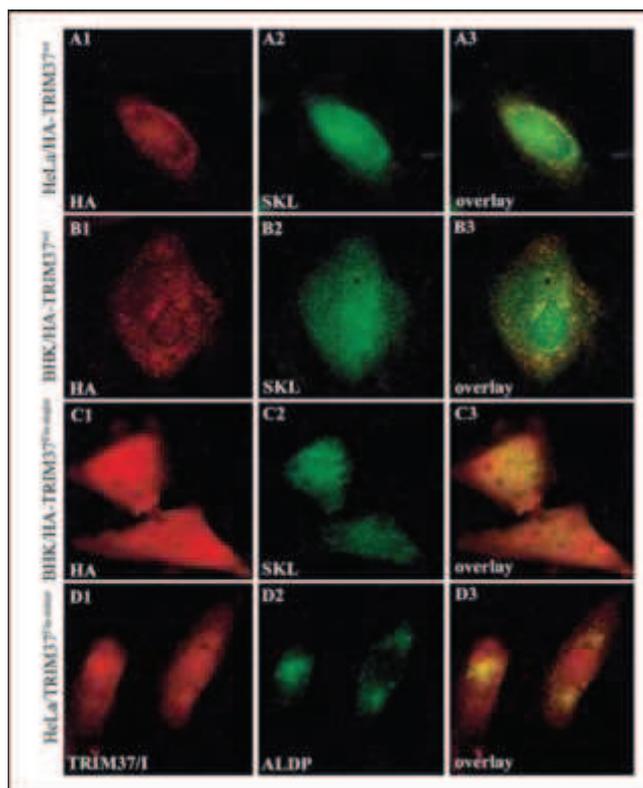


Figure 9. Étude de la colocalisation de TRIM37 et de marqueurs peroxysomes par immunofluorescence selon Kallivarji *et al.* (3).

Enfin, le gène *TRIM37* se trouve dans une région du chromosome 17 amplifiée ou mutée dans environ 40% des cancers du sein. En 2014, L'équipe de Bhatnager *et al.* a confirmé que la protéine TRIM37 possède une activité « ubiquitine ligase », celle-ci est dirigée contre l'histone H2A (26). Ainsi, par modification épigénétique, c'est-à-dire sans altérer directement la séquence de l'ADN, *TRIM37* peut moduler l'expression de nombreux gènes et notamment inhiber des gènes suppresseurs de tumeur. L'implication de cette activité de *TRIM37* dans le phénotype de nanisme MULIBREY n'a pas été explorée à ce jour.

c. Mutations

Le nanisme MULIBREY est dû à une perte de fonction de la protéine TRIM37. Cette hypothèse, posée par le caractère perte-de-fonction de l'ensemble des mutations de *TRIM37* responsable du nanisme MULIBREY décrites à ce jour, a été confirmée par l'étude de souris KO pour le gène *TRIM37* qui présentent un phénotype proche du MULIBREY (5).

A l'heure actuelle, un peu plus de vingt mutations du gène *TRIM37* ont été décrites chez des patients atteints du nanisme MULIBREY.

Il existe en Finlande un effet fondateur avec deux mutations majoritaires. La mutation finlandaise majeure, présente chez 98% des patients d'origine finlandaise, est une transition A>G en 3' du site accepteur d'épissage de l'intron 6 (2), et résulte en une délétion de 5 paires de bases au niveau des nucléotides 493-497 de l'ADNc du gène. La mutation finlandaise majeure ampute la protéine de quasiment tous les domaines fonctionnels excepté les domaines RING et Bbox. La mutation finlandaise mineure est une délétion d'une paire de bases au niveau du nucléotide 2212 de l'ADNc. La mutation entraîne un déphasage et prédit l'apparition d'un codon stop 30 codons en aval. Elle survient en dehors des domaines fonctionnels. La mutation finlandaise mineure est retrouvée chez des patients avec une hétérozygotie composite avec la mutation majeure (2).

Lorsqu'on s'intéresse aux patients non finlandais, une vingtaine de mutations du gène *TRIM37* ont été identifiées (Fig. 10). Ces patients présentent quant à eux des mutations différentes, dites privées, du gène *TRIM37* (11,27,28). Comme les mutations finlandaises, elles sont responsables d'une perte de fonction de la protéine.

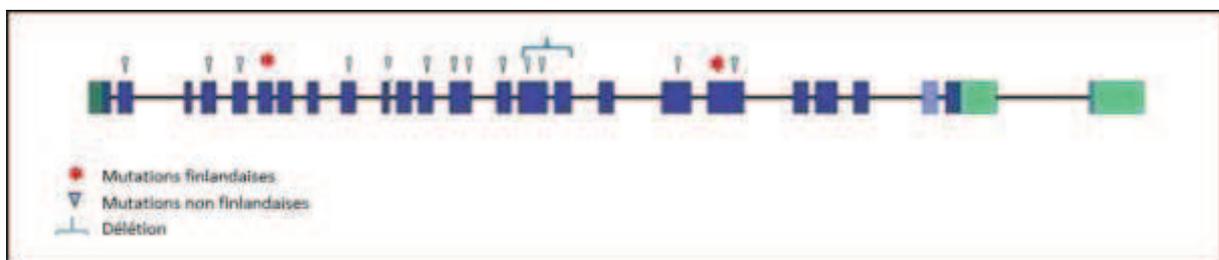


Figure 10. Représentation schématique du gène *TRIM37* – localisation des mutations retrouvées dans la littérature.

L'ensemble des mutations identifiées entraîne soit l'apparition d'une protéine tronquée responsable d'une perte de la fonction de la protéine par absence des domaines fonctionnels ou par perte de la localisation subcellulaire, soit l'absence de production de protéine. Par conséquence, aucune corrélation génotype-phénotype n'a pu être retrouvée chez les patients atteints de nanisme MULIBREY (28).

MATERIEL ET METHODE

1) Recrutement des patients

Nous avons étudié le gène *TRIM37* chez trois patients remplissant les critères cliniques du nanisme MULIBREY. Le premier est une patiente du Dr MATHIEU du CHU d'Amiens, et les patients deux et trois sont ceux du Dr VINCENT-DELORME du CHRU de Lille. Ces patients ont été sélectionnés par les généticiens cliniciens au cours d'une visioconférence inter-régionale (Amiens, Caen, Lille, Rouen), puisqu'ils présentaient un phénotype typique de nanisme MULIBREY, sans confirmation moléculaire.

Les analyses ont été réalisées chez les patients et leurs parents afin de déterminer le caractère *de novo* ou hérité des mutations mises en évidence.

2) Extraction de l'ADN génomique des patients et de leurs apparentés

L'ADN des patients a été extrait à partir d'un prélèvement de sang périphérique sur tube EDTA. La séparation des acides nucléiques du reste des composants d'un lysat cellulaire est basée sur le principe d'une chromatographie d'adsorption. L'ADN extrait se lie à une colonne de silice permettant la purification de l'échantillon. L'élution de l'ADN est réalisée par l'addition d'un tampon de faible force ionique à pH basique, permettant de détacher l'ADN de la colonne. Le coffret QIAamp DNA Blood Maxi Kit (Qiagen®) a été utilisé en suivant les recommandations du fournisseur.

Puis, la qualité et la quantité de l'ADN extrait ont été étudiées par une méthode de type spectrophotométrique, en utilisant le système Nanodrop® (ThermoScientific).

3) Séquençage du gène *TRIM37*

La détermination de la séquence en bases de la région codante et des régions flanquantes du gène *TRIM37* a été réalisée par séquençage Sanger sur l'ADN des patients extrait à partir d'un prélèvement sanguin.

a. PCR

La réaction PCR (Polymerase Chain Reaction) permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier. Pour ce faire, la conception d'amorces complémentaires à l'ADN génomique et encadrant les régions d'intérêt a été réalisée. Ces amorces permettent, en se fixant sur l'ADN génomique des patients par complémentarité des bases, de borner la région d'intérêt. Une série de réactions est ensuite réalisée, permettant la réplication d'une matrice d'ADN double brin. Ainsi, au cours de la réaction de PCR, les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant, l'amplification est donc exponentielle.

La conception des amorces a été réalisée avec le logiciel Primer3, à partir de la séquence génomique de référence obtenu sur GenBank (Gene ID 4591). La spécificité des amorces conçues a été vérifiée *in silico* par deux logiciels : le logiciel BLAST pour l'alignement de chaque amorce et « PCR in-silico » pour l'absence d'amplification parasite non spécifique (Annexe I). Lors de la mise au point de la PCR des régions d'intérêt, chacun des amplicons a été testé dans différents milieux réactionnels, puis la spécificité réelle du produit de PCR a été vérifiée sur gel d'agarose, puis par le séquençage (données non présentées).

Nous avons exploré l'exon 6 pour rechercher la mutation finlandaise majeure (délétion de 5 paires de bases (nucléotides 493-497)) et l'exon 19 pour rechercher la mutation finlandaise mineure (délétion d'une paire de base (nucléotide 2212)), selon le protocole de PCR ci-dessous. Puis un séquençage complet des 25 exons du gène *TRIM37* a été fait selon le même protocole.

Le mélange réactionnel utilisé pour la réalisation de la PCR est le suivant : 0,2 μ M de dNTP, 0,4 μ M d'amorces sens et d'amorces anti sens, 2,5 mM de MgCl₂, Tampon à 1X, Taq polymérase 0,2 U/réaction et 1 μ L d'ADN. Le mélange a été complété par de l'eau « biologie moléculaire » pour obtenir un volume final de 50 μ L.

Le mélange réactionnel est déposé dans le thermocycleur afin que le cycle de PCR puisse être réalisé selon le protocole suivant : après 1 minute de dénaturation à 95°C, la PCR a consisté en 35 cycles de 1 minute à 95°C, 1 minute à température d'hybridation des amorces (Annexes II, 1), 1 minute à 72°C, et une élongation finale de 7 minutes à 72°C.

b. Séquençage des exons d'intérêt

La réaction de séquence que l'on a utilisée est celle de Sanger.

La réaction de Sanger repose sur l'incorporation aléatoire par un ADN polymérase de didéoxynucléotides interrupteurs de chaîne (ddNTP) eux aussi présents dans le milieu réactionnel. Les ddNTP diffèrent des dNTP par l'élimination du OH en 3' du désoxyribose. Cette modification empêche la formation de la liaison phosphodiester entre le ddNTP incorporé dans la chaîne et le nucléotide suivant.

Le séquençage a été réalisé à l'aide du coffret Dye Ex v3.1 (Applied Biosystems®) selon le protocole recommandé par le fournisseur. Le mélange réactionnel suivant a été réalisé : DyeEx 3 µL, Tampon 4 µL, Amorce sens ou antisens (0,3 µM), produit de PCR purifié 13 µL. Le mélange a été complété par de l'eau « biologie moléculaire » pour obtenir un volume final de 25 µL.

La réaction de séquence par amplification s'est déroulée dans un thermocycleur selon le programme suivant : après 1 minute de dénaturation à 96°C, la réaction de séquence a consisté en 35 cycles de 10 secondes à 96°C, 5 secondes à 50°C, 4 minutes à 60°C.

Les produits de réaction de séquence ont ensuite été purifiés en utilisant le coffret DyeEx® 2.0 Spin Kit (Qiagen), reposant sur le principe de purification sur colonne, en suivant les recommandations du fournisseur. Ainsi les produits de séquences sont purifiés et séparés des amorces, dNTP et ddNTP non utilisés qui ont été retenus sur la résine.

Enfin les produits de séquence purifiés ont été déposés dans une plaque de 96 puits adaptable au séquenceur afin de réaliser l'électrophorèse capillaire.

c. Analyse des résultats

Les données issues du séquenceur capillaire ont été analysées en utilisant le logiciel Sequencing Analysis® permettant de visualiser la séquence en bases de la région analysée.

Par ailleurs, le logiciel SeqScape® a également été utilisé. Il permet, en plus de visualiser la séquence en bases, de l'aligner contre un génome de référence et d'annoter les variations identifiées (mutation ou polymorphisme).

4) Recherche de grand réarrangement du gène *TRIM37* par QFM-PCR (PCR multiplex semi-quantitative amplifiant de courts fragments fluorescents)

La recherche de grand réarrangement du gène *TRIM37* a été réalisée en complément du séquençage Sanger afin d'essayer d'identifier la seconde mutation pouvant expliquer le phénotype des patients.

De manière à dépister d'éventuels remaniements de grande taille intéressant le gène *TRIM37*, la mise au point d'une PCR multiplex semi-quantitative amplifiant de courts fragments fluorescents (QFM-PCR) a été réalisée. Cette technique de QFM-PCR permet une détection simple et rapide de remaniements génomiques hétérozygotes à type de délétions ou duplications à l'échelle d'un gène entier ou même d'un unique exon, mutations qui ne sont pas mises en évidence par le séquençage Sanger.

Le principe de la QFM-PCR consiste en une PCR multiplex de plusieurs fragments d'ADN génomique de courte taille, générés pour une ou plusieurs régions issues d'un ou de plusieurs gènes cibles grâce à deux amorces dont l'une est marquée par un fluorochrome. Les amorces sont choisies en fonction des différentes contraintes liées à la séquence génomique d'intérêt et de manière à avoir des T_m similaires pour l'ensemble des amorces. De plus, les fragments d'ADN doivent être de petite taille (<500pb) et cette taille doit différer d'au moins 20 paires de bases afin d'être différenciables lors de la migration sur le séquenceur. L'objectif est de comparer les intensités, révélatrices de la quantité de produit de PCR, entre un échantillon test et un échantillon témoin.

La PCR est réalisée avec un nombre de cycles limité, environ 25 cycles, ce qui permet de stopper la réaction de PCR dans sa phase exponentielle. La quantité du produit de PCR est donc dépendante de la quantité d'ADN de la séquence cible avant amplification, ce qui permet une analyse semi-quantitative des données.

En plus des amplicons du gène étudié, sont amplifiés simultanément dans le même tube un ou deux amplicon(s) témoin(s) qui permettront de fournir une référence pour comparer les électrophorégrammes de différents ADNs et de s'assurer de l'aspect semi-quantitatif de la technique. Ainsi, pour chaque région d'intérêt, le calcul d'un quotient de dosage pour chaque amplicon permet d'estimer le nombre de copies de la région d'intérêt et de mettre en évidence une délétion ou une duplication de cette région.

Après amplification, les produits de PCR multiplex sont séparés en fonction de leur taille lors de la migration sur un séquenceur automatique capillaire.

La première étape a consisté en une étude de la qualité de la QFM-PCR : cette étape a confirmé l'amplification de chaque région d'intérêt, les pics sont aux tailles attendues et bien séparés les uns des autres, ils ont une intensité suffisante pour permettre l'analyse et il n'y a pas de pic parasite.

L'aspect semi quantitatif est confirmé par la superposition des pics pour les patients et témoins, après application du facteur correctif déterminé par l'amplicon de référence.

a. Amplicons témoins

La QFM-PCR a été réalisée en ajoutant aux amorces ciblant les régions d'intérêt un couple d'amorces ciblant l'exon 4 du gène *TRIM37*.

Cet exon présent en 2 exemplaires distinguables (l'un muté et l'autre normal) chez nos trois patients, va être utilisé pour servir de référence quantitative pour l'analyse des autres exons du gène *TRIM37*.

Les amorces sens sont marquées par un fluorochrome (le fluorophore 6-carboxyflorescein ou 6-FAM), les amorces antisens ne sont pas marquées (Annexe I).

Pour chaque exon, les couples d'amorces ont été testés en PCR simple. La quantité et la spécificité des amplicons obtenus ont été contrôlées par électrophorèse sur gel d'agarose 2% (résultats non présentés). Puis, ils ont été étudiés en multiplex chez les patients.

b. Protocole

Les amorces ont été diluées à 20 pmol, et les ADN à 50 ng/μL.

La QFM-PCR est une technique en multiplex, plusieurs exons différents peuvent être étudiés en même temps.

La concentration des différents couples d'amorces de PCR multiplex a été ajustée de manière à obtenir des électrophorégrammes présentant des intensités suffisamment importantes pour être analysées et avec des intensités similaires entre chaque amplicon, témoin de l'absence d'amplification préférentielle et de possible perte de l'aspect semi-quantitatif d'une des PCRs.

Le mélange réactionnel utilisé pour réaliser la QFM-PCR est le suivant : Qiagen Multiplex PCR Master Mix 1X, chaque amorce à une concentration de 0,8 pmol, et de l'eau « biologie moléculaire » QSP 24 μ L. Ensuite, on y ajoute 1 μ L d'ADN dilué à 50 ng/ μ L.

Le programme utilisé pour la PCR doit comporter un nombre de cycle nous permettant d'être quantitatif. Après plusieurs mises au point où nous avons testé différents protocoles d'amplification de manière à utiliser le plus efficace (données non présentées), nous avons choisis de réaliser les analyses avec 24 cycles d'amplifications, selon le protocole suivant : après 600 secondes de dénaturation à 98°C, la PCR a consisté en 24 cycles de 45 secondes à 95°C, 45 secondes à 60°C, 30 secondes à 72°C, et une élongation finale de 300 secondes à 72°C (Annexe II. 2).

Les produits de PCR ont été purifiés avec le coffret DyeEx® 2.0 Spin Kit (Qiagen) en suivant les recommandations du fournisseur. Puis la migration sur séquenceur capillaire a été réalisée, en utilisant un protocole type analyse de fragments, de la manière suivante : 1 μ l de produit de PCR dilué dans 9 μ l de formamide et 2 μ L de LIS600 (marqueur de taille moléculaire).

c. Analyse des résultats

Ces analyses sont réalisées à partir du logiciel GeneMapper®. L'analyse des résultats de QFM-PCR est basée sur la comparaison de la hauteur des pics d'intérêts, après ajout d'un facteur correctif entre les échantillons et le témoin défini à partir du pic référence. Cette dernière étape permet de s'affranchir des différences d'efficacité de chaque PCR, entre les différents échantillons, inéluctables malgré le choix d'amplicons courts et d'amorces de Tm voisin (Fig. 11).

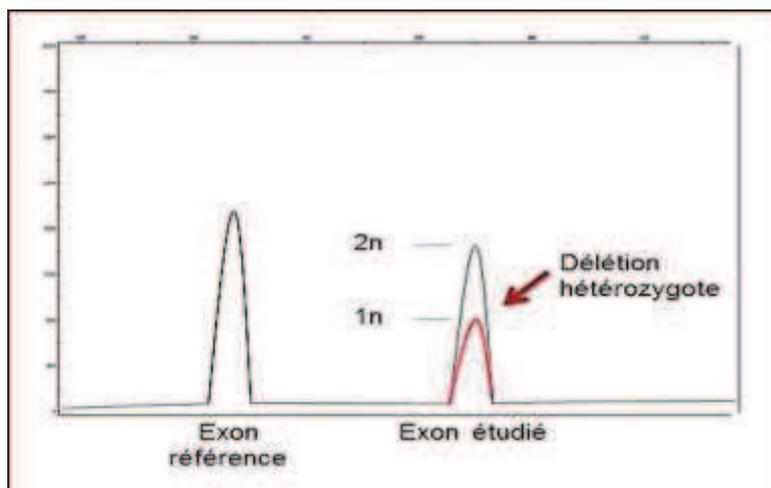


Figure 11. Schématisation des chromatogrammes obtenus après analyse des résultats à l'aide du logiciel GeneMapper®. L'axe des abscisses représente la taille en paires de bases des fragments fluorescents, tandis que l'axe des ordonnées correspond aux fluorescences mesurées en unités de fluorescence. A gauche l'exon de référence avec superposition informatique du pic correspondant à notre patient et nos témoins. A droite, pic correspondant à notre exon étudié.

Le résultat est estimé sous forme d'un quotient de dosage, calculé avec la formule suivante :

$$QD = \frac{(H \text{ pic d'intérêt patient}) / (H \text{ pic d'intérêt témoin})}{(H \text{ pic référence patient}) / (H \text{ pic référence témoin})}$$

Dans cette formule, le dénominateur correspond au facteur de correction qui permet de comparer les QFM-PCR entre deux échantillons.

Les résultats attendus sont :

QD Nbre de copie	Valeur théorique	Intervalle de confiance
Normal	1	0,8 – 1,2
Délétion	0,5	0,3 – 0,7
Duplication	1,5	1,3 – 1,7

5) Confirmation des résultats obtenus par QFM-PCR : la QPCR (PCR quantitative en temps réel)

a. Principe de la méthode

La PCR quantitative en temps réel repose sur la possibilité de suivre au cours du temps (« en temps réel ») le processus de PCR à l'aide d'un indicateur fluorescent.

Les données de fluorescence sont collectées à chaque cycle de PCR et représentent la quantité de produits amplifiés à cet instant.

Si l'on suit la fluorescence au cours du temps d'une PCR en temps réel, on observe une augmentation de cette fluorescence et donc du nombre de fragments de PCR en 3 phases distinctes (Fig. 12) :

- Phase de bruit de fond : La quantité de fragments amplifiés est insuffisante pour générer un signal fluorescent supérieur au bruit de fond (et donc la fluorescence générée). Les données de cette phase ne sont pas exploitables.
- Phase exponentielle : La quantité de fragments amplifiés génère un signal fluorescent supérieur au seuil de détection de l'appareil, puis le nombre de produit amplifié double à chaque cycle.
- Phase de plateau (ou de saturation) : certains composants de la réaction (et en particulier le nombre de molécules de Taq disponibles) deviennent limitants. Le système ne permet plus une amplification exponentielle.

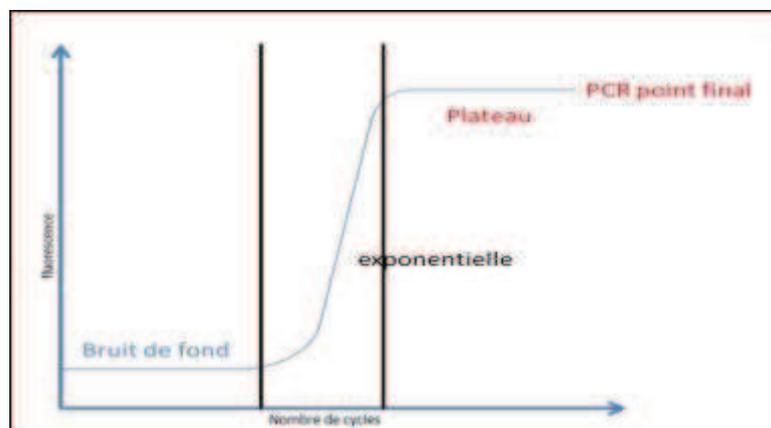


Figure 12. Schématisation du cycle de PCR.

Plus l'échantillon est concentré en molécules cibles, moins il faudra de cycles pour atteindre un point à partir duquel le signal fluorescent est significativement supérieur au bruit de fond. Ce point est défini comme le Ct et apparaît en début de phase exponentielle (Fig. 5). Cette analyse repose sur l'étude de l'ensemble du processus d'amplification de la PCR et pas uniquement la phase de plateau.

Il existe une relation linéaire entre la quantité de molécules cibles présentes à l'origine dans un échantillon et le Ct obtenu pour cet échantillon : cette relation linéaire est la base de la quantification (Fig. 13).

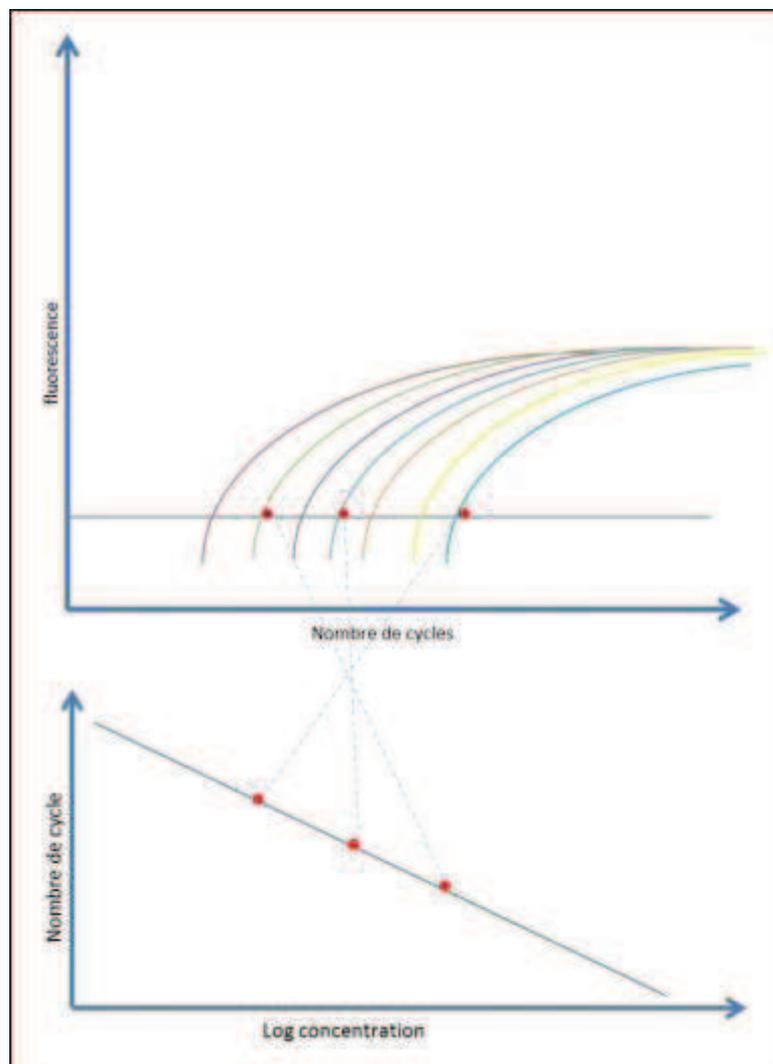


Figure 13. Les points rouges correspondent au Ct : point de croisement entre chaque profil de PCR et la ligne représente la valeur seuil de détection de fluorescence. Lorsqu'on met en relation les Ct et le log base 10 des concentrations initiales en copies cibles on obtient une droite appelée droite standard.

Nous avons réalisé une analyse semi-quantitative, en comparant les courbes de fluorescence d'un échantillon témoin et de nos échantillons tests. La technique repose sur l'utilisation de couples d'amorces spécifiques et d'un reporter fluorescent non spécifique, de type SYBR Green.

b. Protocole

Les mélanges réactionnels de PCR quantitative sont réalisés selon le protocole suivant : dans un volume final de 25 μ L : 50 ng d'ADN, 0,4 μ mol d'amorces spécifiques et la solution MasterMix à 1X.

Puis la réaction de PCR quantitative est réalisée selon le protocole suivant, sur un LightCycler® 480 : après 1 minute de dénaturation à 95°C, la PCR a consisté en 65 cycles de 10 secondes à 95°C, 30 secondes à 60°C et 30 secondes à 72°C (Annexe II. 3).

Les résultats sont ensuite analysés sur le LightCycler® 480 selon le protocole du fournisseur.

6) Séquençage des points de cassure

Le séquençage des points de cassure a été réalisé selon la méthode Sanger, décrite ci-dessus, après réalisation d'une PCR long fragment. La PCR long fragment permet une amplification de fragments d'ADN de plus grande taille pouvant aller jusqu'à 20 kb.

a. Protocole

Afin de réaliser une PCR long fragment, avec le coffret Long-Range PCR (Qiagen®), le mélange réactionnel suivant est utilisé : dNTP 500 μ M, amorces sens et anti sens 0,4 μ M (Annexe I), tampon LongAmp 1X, LongAmp Taq polymérase 2U/réaction et 50 ng d'ADN. Le volume total de 50 μ L a été obtenu avec l'ajout d'eau de type « biologie moléculaire ».

La PCR est réalisée sur thermocycleur avec le programme suivant : après 1 minute de dénaturation à 95°C, la PCR a consisté en 35 cycles de 15 secondes à 95°C, 30 secondes à 60°C, 60 secondes/kb à 72°C, et une élongation finale de 300 secondes à 72°C.

Ces produits ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% afin de vérifier la spécificité de l'amplification (résultats non présentés). Les fragments obtenus sont ensuite séquencés avec le même protocole que décrit précédemment.

RESULTATS

1) Phénotype des patients

a. Patient 1

Il s'agit d'une femme de 27 ans, cinquième enfant de parents non consanguins sans antécédent particulier et originaire du nord de la France (Fig. 14). La grossesse avait été marquée par la mise en évidence d'un retard de croissance intra utérin. Le caryotype prénatal réalisé sur liquide amniotique montrait une formule 46,XX, sans anomalie. A la naissance, à 41 semaines d'aménorrhée plus 3 jours, elle pesait 2,050 kg (-2DS), mesurait 45 cm (-2.5DS) et son périmètre crânien était de 34 cm (M).

L'évolution a été marquée par une aggravation progressive du retard staturo-pondéral, avec à l'âge de 8 ans un poids à 10,600 kg (-4DS) et une taille à 89,3 cm (-6DS). Sur le plan psychomoteur, le développement était normal. Il n'y avait pas non plus de perturbation des interactions sociales.

A l'examen clinique, il existait de multiples angiomes cutanés des membres inférieurs, une dysmorphie faciale associant visage triangulaire, front proéminent, oreilles implantées bas et palais étroit, sans microcéphalie (Fig. 14). Il était également noté des anomalies musculo-squelettiques à type de clinodactylie des 5èmes doigts, hyperlaxité articulaire, genu recurvatum et pieds plats talgus. Enfin il était noté une voix haut perchée. L'examen ophtalmologique complet a mis en évidence une hypermétropie isolée.

Les différentes échographies abdominales réalisées au cours du suivi ont mis en évidence un reflux vésico-urétéral transitoire dans les premières semaines de vie, puis de multiples calcifications pancréatiques dans l'enfance. Au niveau thyroïdien, la patiente a développé de multiples nodules sans conséquences sur la sécrétion hormonale. Le bilan radiologique retrouvait une déminéralisation osseuse diffuse avec os longs grêles et corticales épaisses, une selle turcique en J et un retard d'âge osseux (l'âge osseux selon la méthode de Sauvegrain et Nahum était de 12 ans pour un âge civil de 14 ans et 8 mois).

Une insuffisance ovarienne précoce a été mise en évidence à l'âge de 13 ans. Un traitement hormonal substitutif a été instauré par la suite.

La taille définitive de la patiente est de 128,5 cm, la croissance ayant évolué sur la courbe des - 7DS malgré un traitement par hormone de croissance.

A l'âge de 17 ans, elle a progressivement développé une péricardite constrictive, confirmée par la réalisation d'un cathétérisme cardiaque et compliquée de signes d'insuffisance cardiaque droite, à type d'hépatomégalie puis de cirrhose. Malgré le traitement médicamenteux, une prise en charge chirurgicale de décortication péricardique à l'âge de 26 ans a été nécessaire.

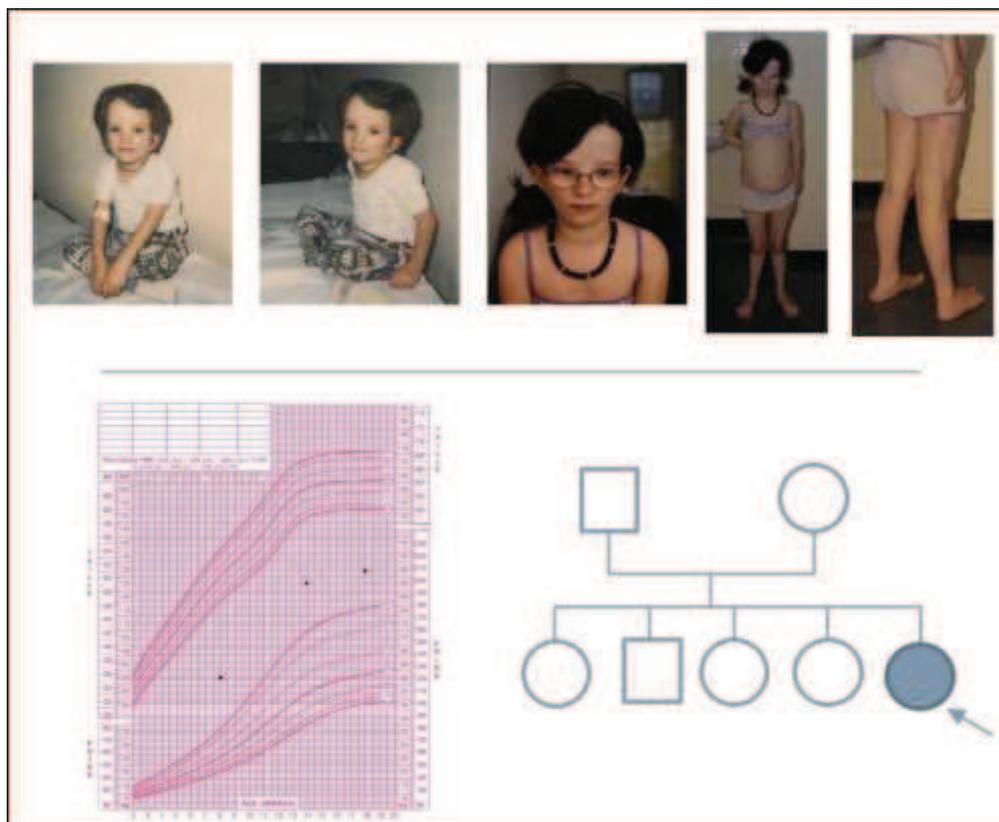


Figure 14. Phénotype du patient 1 de gauche à droite : à l'âge de 8ans, puis 16 ans, en haut.
Courbe de croissance et arbre généalogique en bas.

b. Patient 2

Il s'agit d'un garçon de 5 ans, premier enfant d'un couple non apparenté, sans antécédent particulier et sans origine finlandaise connue (Fig. 15). Il est né à 40 semaines d'aménorrhée des suites d'une grossesse marquée par le développement d'un diabète gestationnel ayant nécessité un régime sans traitement insulinique, et par un retard de

croissance intra utérin. A la naissance, il pesait 2,240 kg (-2DS), mesurait 47cm (-2DS) et son périmètre crânien était de 33 cm (-2DS).

L'évolution a été marquée par l'aggravation du retard de croissance staturo-pondérale, sans déficit en GH : à l'âge de 3 ans, sa courbe pondérale était à -3,5DS et sa courbe staturale à -2,5DS.

L'examen clinique notait une dysmorphie faciale avec un visage triangulaire, un petit menton et un front proéminent (Fig. 15). Il existait par ailleurs une clinodactylie des 5èmes doigts, un pectus excavatum et une voix haut perchée. Le reste de l'examen était sans particularité, et le développement psychomoteur était normal. Les explorations biologiques, incluant un dosage de GH, de cortisol, des anticorps anti-transglutaminase ainsi qu'un bilan thyroïdien, étaient normales. Devant la persistance du retard staturo-pondéral, un traitement hormonal substitutif a été mis en place à partir de l'âge de 5 ans.

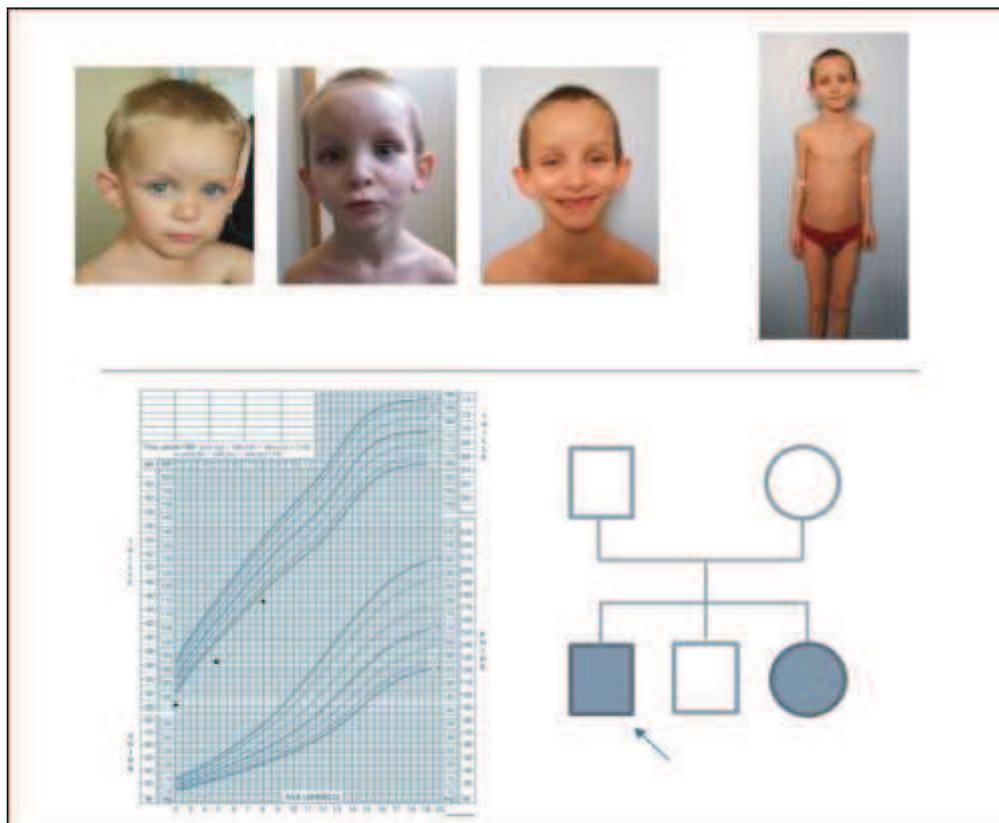


Figure 15. Phénotype du patient 2 de gauche à droite : à l'âge de 3 ans, 5 ans puis 8 ans.
Courbe de croissance et arbre généalogique en bas.

c. Patient 3

Il s'agit d'une fille de 3 ans, sœur du patient 2 et 3ème enfant du couple (Fig. 16). Elle est née à 38 semaines d'aménorrhée à l'issue d'une grossesse sans particularité. A la naissance, elle pesait 1,950 kg (-3DS), mesurait 47 cm (-2DS) et son périmètre crânien était de 33 cm (-2DS). L'évolution a été marquée par l'apparition d'un retard de croissance staturo-pondéral. A l'âge de 3 ans elle pesait 8,800 kg (-3.5DS) et mesurait 84 cm (-3.2DS). Elle présentait la même dysmorphie faciale que son frère (Fig. 16). L'examen clinique mettait en évidence une tuméfaction douloureuse tibiale gauche en rapport avec une ostéodystrophie, diagnostic confirmé par l'imagerie et la biopsie osseuse. Le reste de l'examen était sans particularité, et le développement psychomoteur était normal.

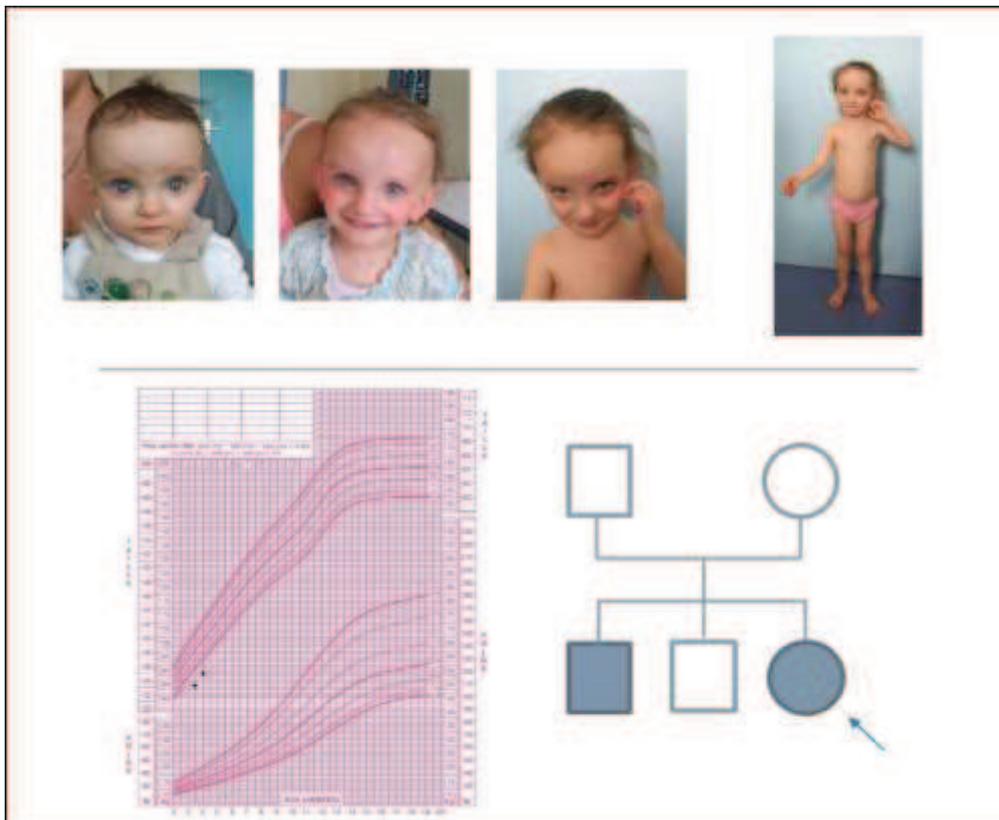


Figure 16. Phénotype du patient 3 de gauche à droite : à l'âge d'un an, 2 ans puis 4 ans.

Courbe de croissance et arbre généalogique en bas.

2) Analyses moléculaires

a. Bilan initial

Les analyses génétiques réalisées dans le cadre du bilan étiologique initial ont permis d'éliminer les principaux diagnostics différentiels et notamment l'existence d'une anomalie chromosomique déséquilibrée (CGH-array 44K, Agilent), un syndrome de Silver-Russell avec recherche d'une disomie uniparentale maternelle du chromosome 7, une disomie uniparentale maternelle du chromosome 14 et une achondroplasie par étude du gène *FGFR3* chez la première patiente.

Pour le patient 2, l'analyse chromosomique par CGH-array (44K, Agilent) n'a pas trouvé de déséquilibre chromosomique, la recherche de syndrome de Silver-Russell était négative.

Enfin, la patiente 3, du fait de son lien de parenté avec le patient 2, n'a pas bénéficié d'analyses en CGH-array ou de recherche de syndrome de Silver-Russell, puisque ce bilan était négatif chez ce dernier.

b. Séquençage complet du gène *TRIM37*

Le séquençage de l'exon 6 et de l'exon 19 n'a pas permis de mettre en évidence de variation de séquence, excluant la présence des mutations finlandaises.

Le séquençage de l'ensemble de la région codante du gène *TRIM37* a mis en évidence une variation de séquence à l'état hétérozygote dans l'exon 4 chez les trois patients : c.181C>T ; p.Arg61* (Fig. 17). Cette variation non-sens conduit soit à la synthèse d'une protéine amputée de l'ensemble de ses domaines fonctionnels, soit à l'absence de production de protéine par dégradation de l'ARNm. Cette mutation n'a jamais été rapportée dans la littérature.

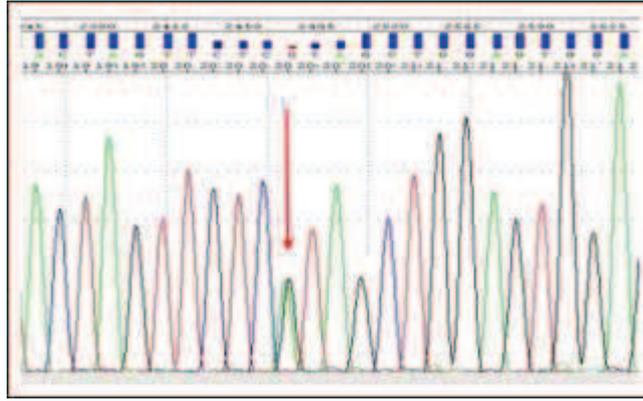


Figure 17. Mutation ponctuelle : c.181C>T ; p.Arg61*.

L'enquête parentale a retrouvé la même mutation chez la mère de notre patiente 1, et la mère des patients 2 et 3.

c. Recherche de grand réarrangement par QFM-PCR

L'analyse en QFM-PCR a permis de mettre en évidence un grand réarrangement chez chacun de nos patients :

- Chez la patiente 1 :

Une délétion des exons 15 et 16 à l'état hétérozygote (Fig. 18). Cette mutation entraîne un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop prématuré (c.1315_1667del p.Arg439Valfs*5). Il s'agit d'une mutation tronquante qui survient en dehors des domaines fonctionnels. Le caractère pathogène de cette mutation a néanmoins pu être affirmé par une analyse de la littérature puisqu'une délétion des exons 15 et 16 avait déjà été rapportée à l'état homozygote chez un patient présentant un nanisme MULIBREY. Les études fonctionnelles avaient permis de conclure à son caractère perte de fonction du fait d'une perte de localisation subcellulaire de la protéine.

L'enquête parentale a retrouvé cette délétion chez le père de la patiente, confirmant l'implication de second allèle dans la pathologie et le caractère hétérozygote composite des mutations de *TRIM37* chez cette patiente.

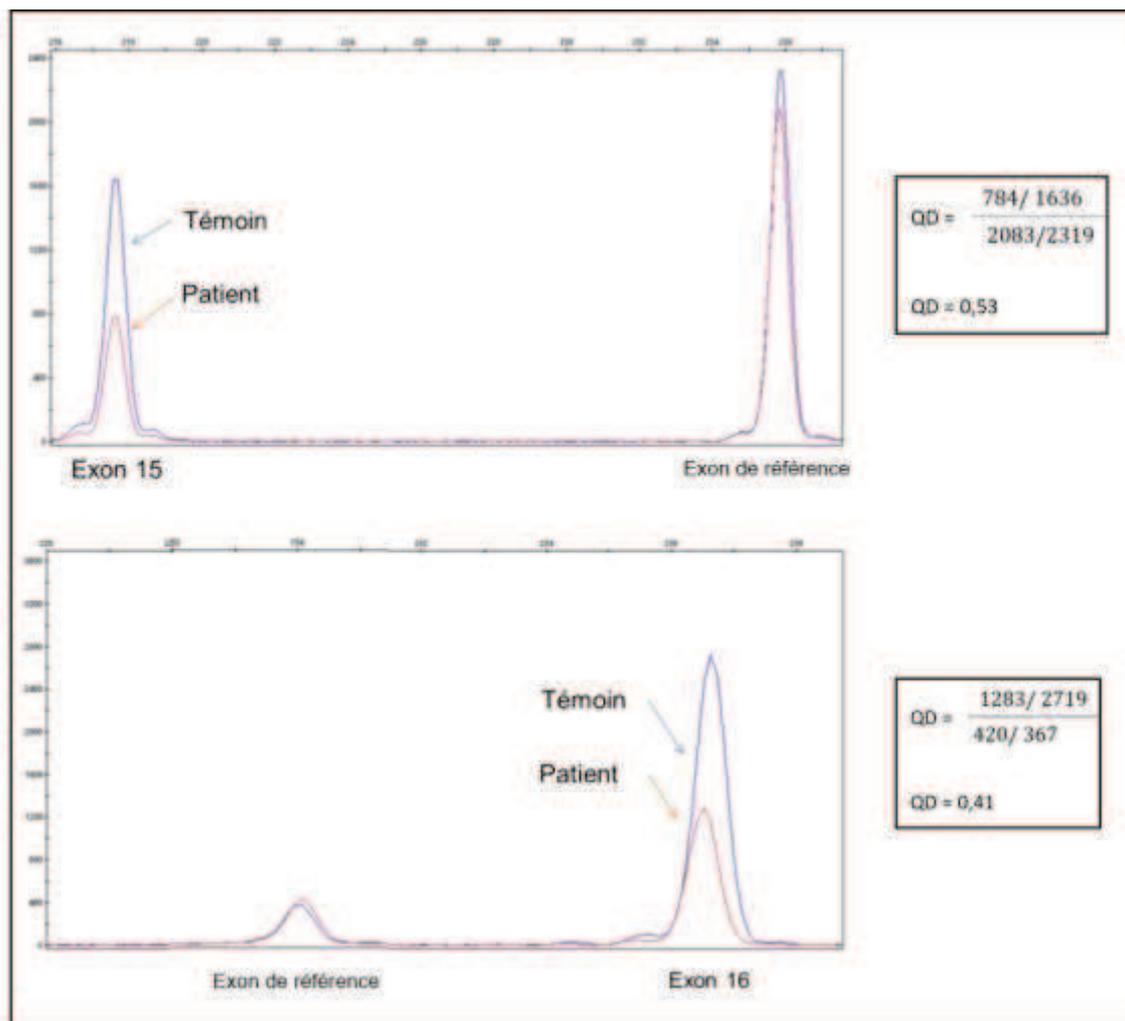


Figure 18. Profil de la QFM-PCR de l'exon 15 en haut et de l'exon 16 en bas. L'axe des abscisses représente la taille en paires de bases des fragments fluorescents, tandis que l'axe des ordonnées correspond aux fluorescences mesurées en unité de fluorescence.

- Chez les patients 2 et 3 :

Une délétion de l'exon 9 à l'état hétérozygote (Fig. 19). Cette mutation est responsable d'un décalage du cadre de lecture et de l'apparition d'un codon stop prématuré (c.685_809del ; p.Leu229*). Il s'agit d'une mutation de type perte de fonction car elle ampute la protéine d'une partie du domaine Bbox, domaine qui a montré son importance pour la localisation peroxysomale de *TRIM37*. Cette mutation n'a jamais été décrite dans la littérature.

L'enquête parentale a confirmé l'héritabilité paternelle de cette mutation et le caractère hétérozygote composite de ces mutations du gène *TRIM37* chez ces deux patients.

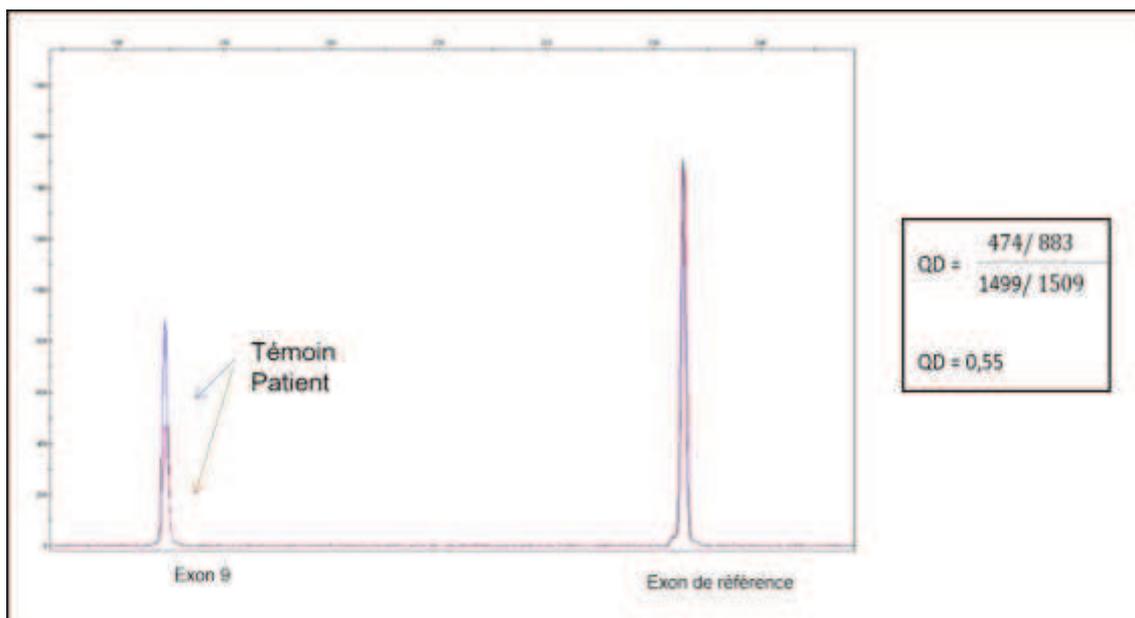


Figure 19. Profil de la QFM-PCR de l'exon 9. L'axe des abscisses représente la taille en paires de bases des fragments fluorescents, tandis que l'axe des ordonnées correspond aux fluorescences mesurées en unité de fluorescence.

d. Confirmation des résultats obtenus par QPCR

Afin de confirmer les résultats de QFM PCR, nous avons réalisé une PCR temps-réel semi-quantitative des exons 15 et 16 chez la patiente 1 et de l'exon 9 chez les patients 2 et 3.

Les courbes de fluorescence obtenues à l'issue de la PCR en temps réel et en fonction du nombre de cycles sont les suivantes (Fig. 20 et 21) :

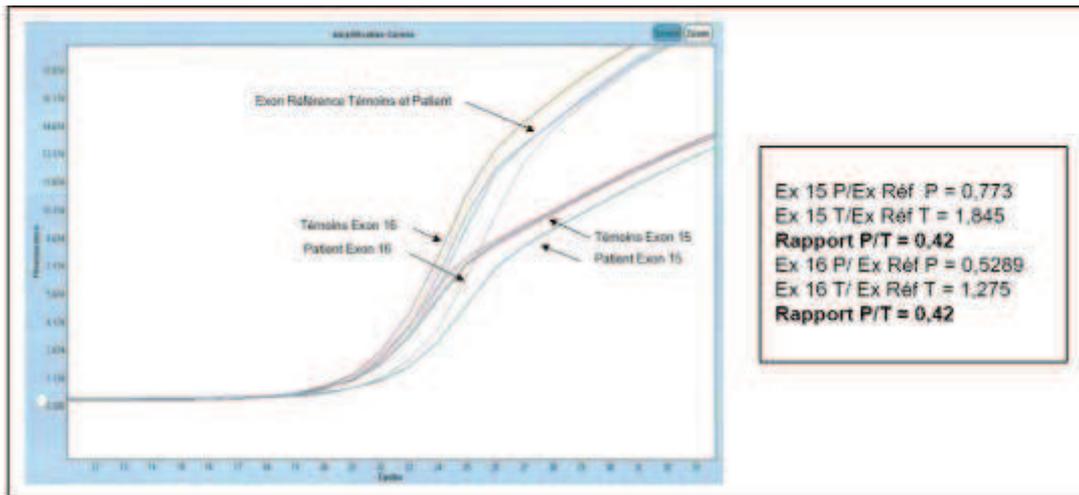


Figure 20. Courbe de QPCR pour les exons 15 et 16. L'axe des abscisses représente le nombre de cycles, tandis que l'axe des ordonnées correspond aux fluorescences mesurées en unité de fluorescence.

La détermination des Ct par le logiciel du LightCycler® Roche 480 a permis d'établir les rapports de Ct pour nos patients comparés à nos témoins. Les résultats retrouvent, après normalisation avec l'exon de référence, un rapport de Ct (patient/témoin) à 0,42, et confirment la délétion des exons 15 et 16 du gène *TRIM37*, déjà obtenus par QFM-PCR, pour la patiente 1 et son père.

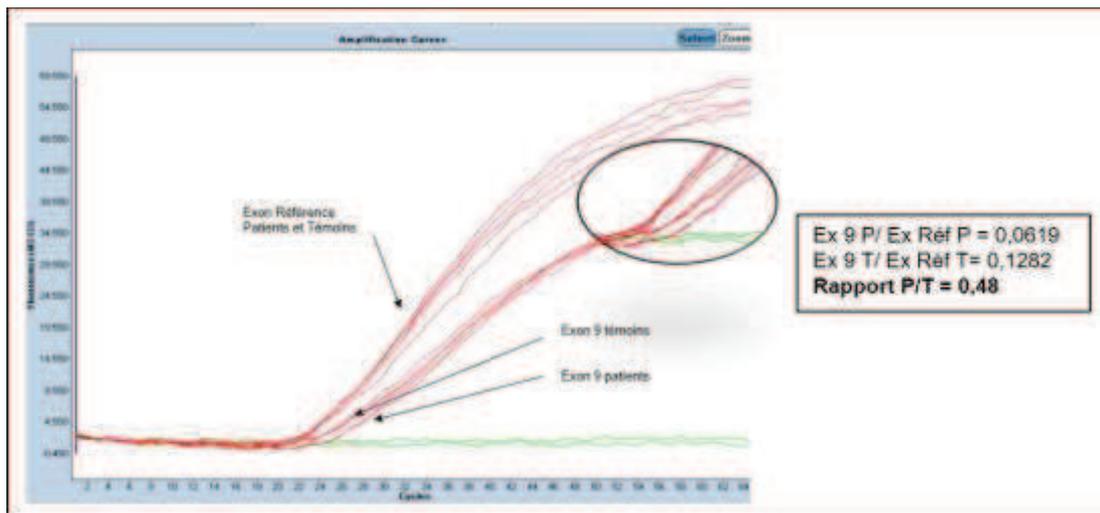


Figure 21. Courbe de QPCR pour l'exon 9. L'axe des abscisses représente le nombre de cycles, tandis que l'axe des ordonnées correspond aux fluorescences mesurées en unités de fluorescence.

De même, les résultats de QPCR pour les patients 2 et 3 retrouvent, après normalisation, un rapport de Ct à 0,48 ce qui confirme la délétion de l'exon 9 du gène *TRIM37* chez eux ainsi que chez leur père.

e. Séquençage des points de cassure

Pour délimiter les bornes de ces grands réarrangements, un séquençage des points de cassure a été réalisé par séquençage Sanger.

Pour la patiente 1, nous avons choisis d'utiliser l'amorce sens de l'exon 14 et l'amorce antisens de l'exon 17 selon le schéma suivant (Fig. 22) :

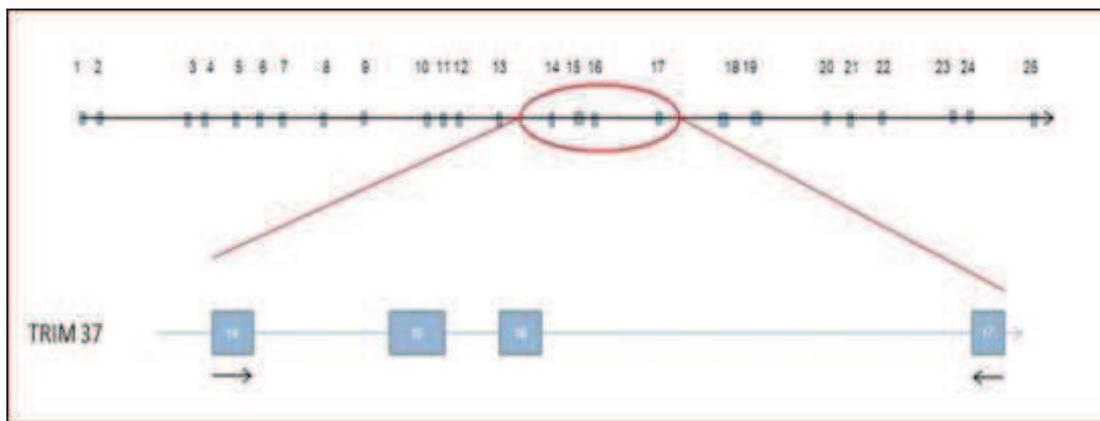


Figure 22. Localisation des amorces utilisées pour le séquençage des points de cassure de la délétion des exons 15 et 16.

Une électrophorèse sur gel d'agarose à 2% a ensuite été réalisée afin de s'assurer de la présence d'un fragment amplifié et d'évaluer sa taille (résultat non présenté).

Le séquençage Sanger du fragment obtenu a permis de préciser la localisation des points de cassure, dans des séquences *Alu*, avec présence d'une homologie de séquence parfaite de 25 paires de bases au niveau du point de recombinaison (Fig. 23 et 24).



Figure 23. Schématisation de la séquence obtenue chez notre patient 1. En rouge est représentée la séquence d'homologie.

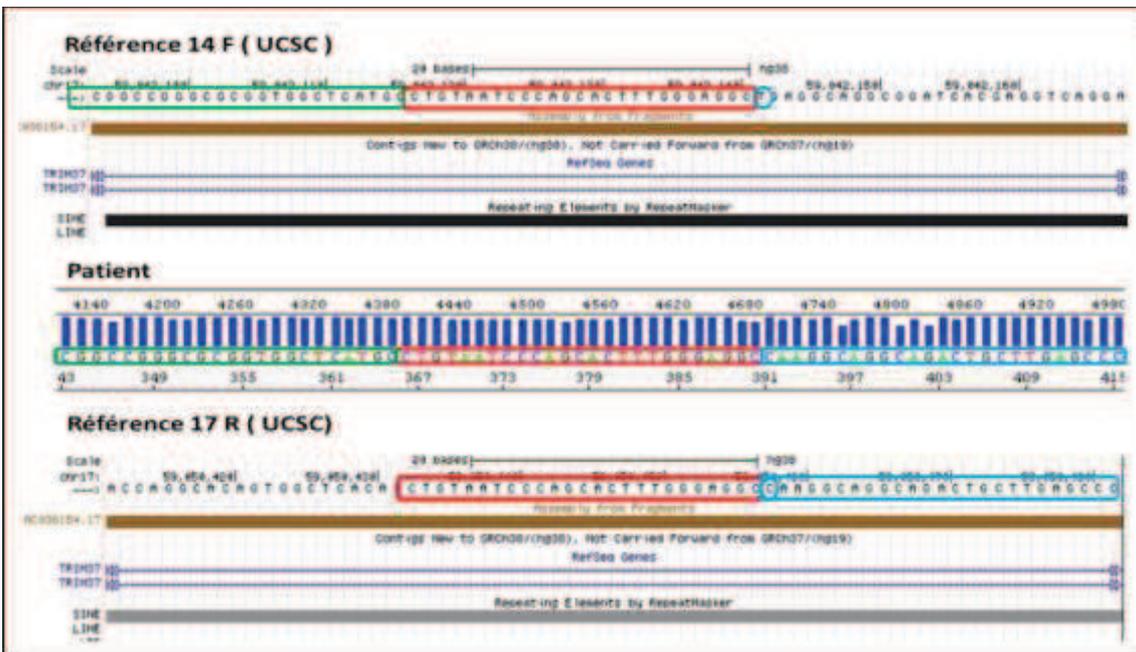


Figure 24. Séquences issues de la base de données UCSC représentant les points de cassure de la délétion des exons 15 et 16. En haut est représentée la séquence attendue de l'exon 14, en bas la séquence attendue de l'exon 17. Au milieu la séquence obtenue chez notre patient. Est encadrée en rouge la séquence d'homologie.

Pour la délétion de l'exon 9, nous avons choisi de réaliser plusieurs amorces sens et antisens introniques, de façon à obtenir un fragment amplifiable. La conception s'est faite selon le schéma suivant (Fig. 25):

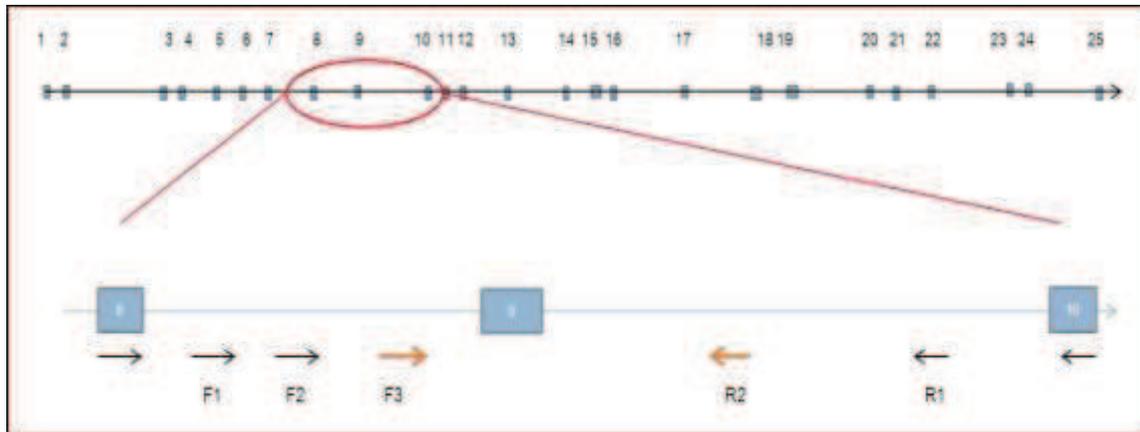


Figure 25. Localisation des amorces utilisées pour le séquençage des points de cassure de la délétion de l'exon 9. En orange les amorces utilisées pour le séquençage Sanger.

Le séquençage a permis de préciser la localisation des points de cassure. Contrairement au résultat précédent, il n'existe pas une homologie stricte, mais il existe une homologie importante entre les deux séquences *Alu* où ont eu lieu les points de cassure (Fig. 26 et 27).



Figure 26. Schématisation de la séquence obtenue chez nos patients 2 et 3.

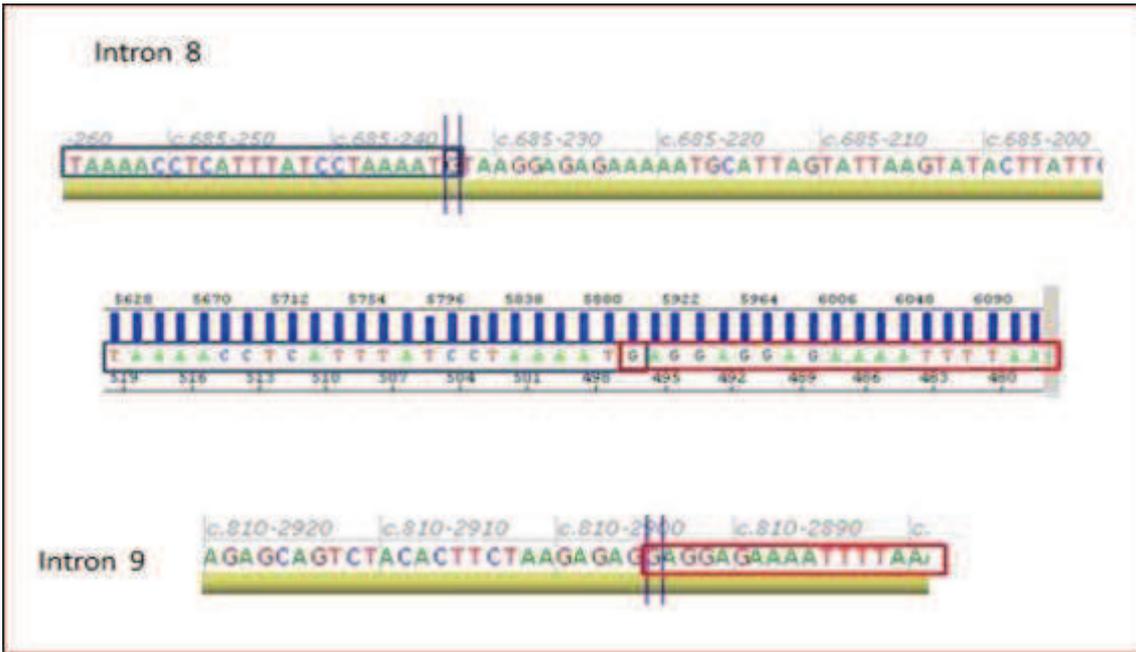


Figure 27. Séquences des points de cassure de la délétion de l'exon 9, issues du logiciel SeqScape®. En haut est représentée la séquence attendue de l'intron 8, en bas la séquence attendue de l'intron 9. Au milieu la séquence obtenue chez notre patient.

3) Synthèse des résultats obtenus

Nous avons donc identifié, par plusieurs méthodes, une hétérozygotie composite chez chacun des patients avec association d'une mutation ponctuelle et d'un grand réarrangement à type de délétion d'un ou plusieurs exons.

Ainsi, nous avons pu prouver, sur le plan moléculaire, le diagnostic de nanisme MULIBREY.

La figure 1, ci-dessous, résume les différentes mutations identifiées sur l'arbre généalogique des deux familles (Fig. 28) :

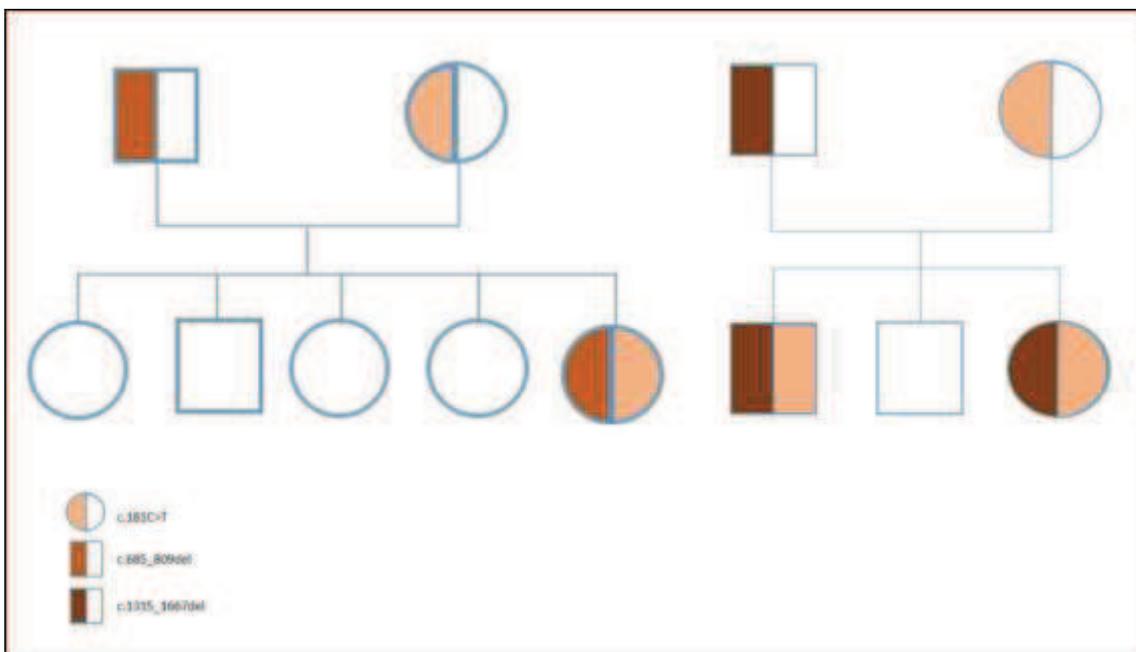


Figure 28. Mutations identifiées chez chacun des patients et de leurs apparentés.

DISCUSSION

Nous rapportons dans cette étude trois nouveaux patients non finlandais présentant un phénotype classique de nanisme MULIBREY et un génotype montrant une hétérozygotie composite pour des mutations du gène *TRIM37*. Deux des trois mutations identifiées n'ont jamais été rapportées dans la littérature. Parmi ces mutations, deux sont des réarrangements intra-géniques, type de mutation qui n'avait été mis en évidence qu'une seule fois dans cette pathologie (28).

1) Clinique

a. Critères diagnostiques

Le nanisme MULIBREY est un syndrome cliniquement identifiable, classiquement caractérisé par l'association d'un retard de croissance pré et post natal, d'une dysmorphie faciale caractéristique, d'anomalies osseuses, et d'anomalies oculaires. Mais, comme un grand nombre de pathologies d'origine génétique, le nanisme MULIBREY est caractérisé aussi par une hétérogénéité clinique inter et intrafamiliale, avec une possible atteinte multi organe (1).

Afin de nous aider dans l'orientation diagnostique, un score clinique composé de cinq critères majeurs (retard de croissance, anomalies radiologiques caractéristiques, dysmorphie faciale, anomalie oculaire et antécédent familial de MULIBREY) et de quatre critères mineurs (voix haut perchée, hépatomégalie, naevi cutanés, dysplasie fibreuse des os longs) a été proposé par Karlberg *et al.* (1). Le nanisme MULIBREY est évoqué lorsque trois critères majeurs et un critère mineur ou deux critères majeurs et trois critères mineurs sont présents. Les signes cliniques pris en compte dans ce score sont les principaux signes de la maladie, avec une fréquence supérieure à 70% pour chacun d'eux. Dans notre étude, la patiente 1 présente trois critères majeurs et trois critères mineurs, les patients 2 et 3 présentent trois critères majeurs et deux critères mineurs. Tous les patients rapportés dans la littérature à ce jour répondent à cette définition clinique.

b. Variabilité phénotypique

En dehors de ces signes récurrents, il existe une variabilité phénotypique importante, avec de nombreux signes récurrents. L'observation de nos 3 patients confirme cette variabilité.

La sévérité du retard de croissance est variable chez nos patients. En effet, la patiente 1 présente un retard de croissance à -6DS, beaucoup plus sévère que les patients 2 et 3 respectivement à -2,5 DS et -3,2 DS.

Les autres atteintes d'organes sont elles aussi variables. La première patiente a développé une péricardite chronique constrictive, des anomalies pancréatiques, et une insuffisance ovarienne prématurée, non retrouvés chez les patients 2 et 3. Néanmoins, étant donné la différence d'âge, il pourrait ne s'agir que d'une variabilité due à une pénétrance dépendante de l'âge.

Les patients 2 et 3, issus de la même fratrie, mettent en évidence la variabilité intrafamiliale : la patiente 3 présente une ostéodystrophie tibiale non retrouvée chez son frère ainsi qu'un retard de croissance staturo-pondérale plus marqué, alors que celui-ci présente les points rétinien jaunâtres. Ces différences intrafamiliales ont déjà été mises en évidence dans des familles finlandaises (1) et non finlandaises (10,27,29).

c. L'atteinte cardiaque : un facteur pronostic

L'atteinte cardiaque, absente des critères diagnostiques, est la principale atteinte conditionnant le pronostic des patients atteints de nanisme MULIBREY (15). Nos trois patients ont bénéficié d'un bilan hépatique et cardiaque. Notre première patiente a présenté une cardiopathie sévère, de type péricardite constrictive, mise en évidence dans le bilan étiologique d'une hépatomégalie découverte à l'âge 17 ans. Une prise en charge chirurgicale a été nécessaire à l'âge de 26 ans. Le patient 2 présentait déjà, à 7 ans, une hépatomégalie ; le bilan cardiaque ne retrouvait pas de signe de péricardite chronique constrictive mais une fonction cardiaque modérément diminuée. La patiente 3 présentait également une hépatomégalie, avec un bilan cardiaque normal, à l'âge de 4 ans. La fréquence des atteintes cardiaques dans ce syndrome est estimée à 15% dans l'étude de Karlberg *et al.* (1) ; mais les auteurs précisent que cette fréquence est supérieure à 50% à l'âge adulte, mettant ainsi en évidence la pénétrance liée à l'âge pour cette atteinte (1). L'hépatomégalie, signe appartenant

aux critères mineurs du diagnostic de MULIBREY, est le plus souvent congestive (18) Elle est pour cela une cause de révélation classique et le premier signe d'une cardiopathie débutante dans cette pathologie (30,31). La notion de cardiopathie débutante chez notre deuxième patient et l'absence de cardiopathie chez le patient 3 de notre étude, ayant respectivement 7 et 4 ans, et l'existence d'une péricardite constrictive chez la patiente 1 découverte à 16 ans, semblent également renforcer l'hypothèse d'une pénétrance liée à l'âge. Enfin, certaines études évoquent une fréquence plus élevée de cardiopathie chez les patients non finlandais (13,14,29). Toutefois, il semble difficile de considérer cette différence comme significative, en raison du faible nombre de cas rapportés, d'autant qu'un biais dû à la publication des cas les plus sévères (pronostic vital engagé en cas de cardiopathie) en dehors de la cohorte de patients finlandais n'est pas à exclure. Il est donc important de répéter les explorations cardiologiques visant à mettre en évidence une cardiopathie débutante, en particulier s'il se développe une atteinte hépatique, chez les patients atteints de nanisme MULIBREY. La prise en charge chirurgicale étant nécessaire dès lors qu'un patient est symptomatique (14).

d. Diagnostic différentiel : le syndrome Silver-Russell

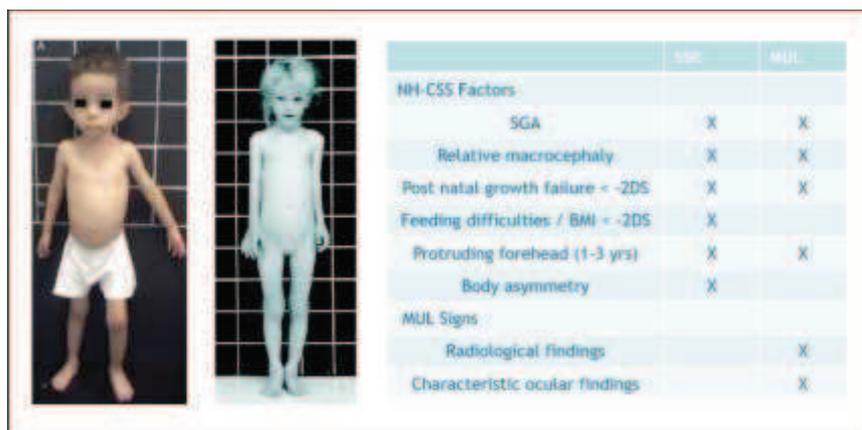
Le nanisme MULIBREY n'est pas le seul syndrome génétique caractérisé par un retard de croissance, une dysmorphie faciale et un développement neurologique normal.

De par une présentation phénotypique proche, le principal diagnostic différentiel du nanisme MULIBREY est le syndrome de Silver-Russell (SSR) (OMIM 180860).

Le SSR est une affection cliniquement et génétiquement hétérogène (32). Les différents critères diagnostiques définis pour guider les analyses moléculaires sont très proches de ceux du nanisme MULIBREY (33) (Fig. 29). En effet, les critères principaux du SSR sont le retard de croissance pré et postnatal, la macrocéphalie relative, le faciès triangulaire, les difficultés alimentaires et l'asymétrie corporelle. Les trois premiers sont considérés comme des critères majeurs du MULIBREY, le quatrième a été retrouvé associé au MULIBREY dans 30% des cas, le dernier n'a lui jamais été associé au MULIBREY mais il est le critère le moins constant du SSR. De plus, d'autres signes cliniques non inclus dans les critères diagnostiques, comme la clinodactylie des 5^{èmes} doigts, peuvent être retrouvés dans ces deux syndromes, tout comme l'absence de retard des acquisitions psychomotrices.

Nos patients présentent un retard de croissance, un faciès triangulaire, une macrocéphalie relative et une clinodactylie des 5^{èmes} doigts. De par sa fréquence plus élevée, il est aisé de comprendre pourquoi le premier diagnostic évoqué chez eux fut le SSR. Dans les deux familles, cette hypothèse diagnostique a amené à explorer les différentes causes moléculaires responsables de ce syndrome. Ces analyses se sont avérées négatives.

Par ailleurs, le SSR est hétérogène sur le plan génétique, et dans 40 % des cas aucune anomalie moléculaire n'est mise en évidence (32). Devant une suspicion de SSR sans anomalie moléculaire identifiable, et en l'absence d'asymétrie corporelle, il nous semble important d'évoquer le nanisme MULIBREY et d'analyser le gène *TRIM37* si les critères cliniques du MULIBREY sont remplis. Cette analyse est d'autant plus importante qu'elle permet, en cas de confirmation moléculaire, de proposer un suivi cardiologique approprié.



	SSR	MUL
NIH-CSS Factors		
SGA	X	X
Relative macrocephaly	X	X
Post natal growth failure < -2DS	X	X
Feeding difficulties / BMI < -2DS	X	
Protruding forehead (1-3 yrs)	X	X
Body asymmetry	X	
MUL Signs		
Radiological findings		X
Characteristic ocular findings		X

Figure 29. De gauche à droite phénotype d'un patient atteint de syndrome de Silver-Russell d'après Carolina Galaz-Montoya, *et al.* (34), un patient atteint de syndrome MULIBREY d'après Karlberg *et al.* (9). Critères cliniques du syndrome de Silver-Russell comparés à ceux du nanisme MULIBREY.

Les autres diagnostics différentiels incluent des syndromes rares avec un retard staturo-pondéral comme le syndrome SHORT qui présente l'association d'une petite taille (short stature (S)), d'une hyperlaxité articulaire ou d'une hernie inguinale ou les deux (hyperextensibility of joints or inguinal hernia or both (H)), d'une hypotension oculaire (ocular depression (O)), d'une anomalie de Rieger (R), et d'un retard à l'éruption des dents (teething delay (T)) (35) ; et le syndrome 3M associant un retard de croissance pré- et post-natal proportionné, une dysmorphie faciale caractéristique (une tête relativement grande, une

dolichocéphalie, des bosses frontales, un visage triangulaire, un menton pointu, un nez retroussé, des lèvres pleines, des sourcils fournis, un long philtrum, et une hypoplasie malaire), et des anomalies radiologiques particulières (os longs et des côtes frêles et aplatissement antérieur des corps vertébraux) (36).

2) Génétique

a. Les mutations de *TRIM37* sont de type perte de fonction

La fréquence importante des deux mutations principales du gène *TRIM37* est principalement due à la proportion élevée de patients finlandais, plus de 80%, rapportée dans la littérature. Il est d'ailleurs à noter que l'ensemble des patients non finlandais décrits à ce jour présentent des mutations différentes, privées.

Toutes ces mutations sont de type perte de fonction. Le plus souvent, il s'agit de mutations non-sens ou « frameshift » aboutissant à l'absence de protéine ou la production d'une protéine tronquée dépourvue de domaines fonctionnels importants (28). Une seule mutation faux-sens a été rapportée à ce jour, les analyses fonctionnelles ont permis de mettre en évidence non pas une modification de la protéine mais une perte de localisation subcellulaire (peroxysomale) et prouvant donc son caractère perte de fonction (28).

L'ensemble des mutations étant perte de fonction, il n'y a donc pas d'argument pour penser qu'il existe des corrélations génotype-phénotype. La comparaison du phénotype des patients finlandais et non finlandais confirme cette hypothèse puisqu'il ne semble pas y avoir de différence significative entre ces deux cohortes. Néanmoins, une étude sur un plus grand nombre de patients non finlandais serait nécessaire pour conclure.

b. Les mutations de nos patients : des mutations délétères perte de fonction

Parmi les mutations rapportées chez nos patients, deux (c.181C>T ; p.Arg61* et c.685_809del ; p.Leu229*) n'ont jamais été rapportées à ce jour. La dernière, c.1315_1667del ; p.Arg439Valfs*5, correspondant à une délétion des exons 15 et 16, a déjà été décrite précédemment (28). Néanmoins, après analyse de la taille de cette délétion et la caractérisation des points de cassure, il s'avère que ce remaniement est différent de celui précédemment rapporté. Malgré cela, leur caractère pathogène ne fait pourtant pas de doute.

- La mutation c.181C>T ; p.Arg61* survient dans l'exon 4 et ampute la protéine de l'ensemble de ses domaines fonctionnels.
- La délétion de l'exon 9, c.685_809del ; p.Leu229*. Le codon stop prématuré intervient au sein du domaine Bbox, déjà connu pour son implication dans la localisation peroxysomale.

- La délétion des exons 15 et 16, c.1315_1667del ; p.Arg439Valfs*5, est également tronquante, mais survient en dehors des domaines fonctionnels. Mais une délétion des exons 15 et 16 avait déjà été rapportée à l'état homozygote chez un patient présentant un nanisme MULIBREY, son caractère pathogène avait donc été affirmé (28).

c. Les délétions intra géniques : des remaniements médiés par les séquences *Alu*

Nous avons montré que pour les 2 mutations c.1315_1667del p.Arg439Valfs*5 (patient 1) et c.685_809del ; p.Leu229*, les points de cassure sont situés dans des séquences répétées de type *Alu* (Fig. 30).

Les séquences *Alu* sont les séquences répétées et dispersées de petite taille (environ 300 paires de bases) les plus abondantes du génome humain. Elles sont environ au nombre d'un million, ce qui représente à peu près 10% du génome humain (37). Elles appartiennent à la famille des séquences *SINE* (*short interspersed elements*).

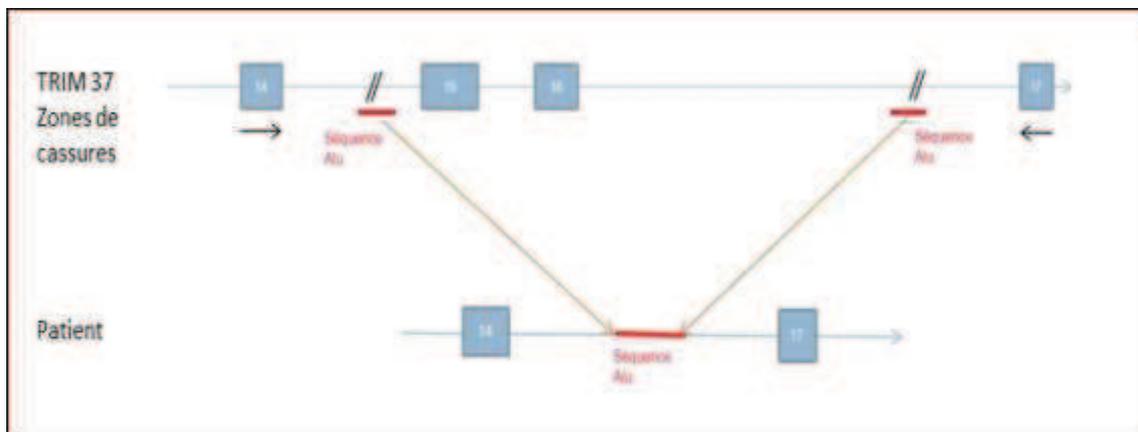


Figure 30. Schématisation des points de cassure de la délétion des exons 15 et 16.

Les réarrangements géniques médiés par des séquences homologues, notamment les séquences *Alu*, sont bien connus (38) et les mutations de type délétion ou duplication sont retrouvées en pathologie humaine. De nombreux gènes riches en séquences *Alu*, comme *SPAST*, *NLRP7*, ou *GCNT2* (39–41), sont ainsi fréquemment le site de recombinaisons intragéniques. Dans le gène *TRIM37*, une seule délétion a été rapportée à ce jour chez les 135 patients. Pourtant, d'après la base de données UCSC, le gène *TRIM37* est particulièrement

riche en séquence *Alu*, puisque 123 de ces séquences sont répertoriées dans les parties introniques du gène, ce qui correspond à une séquence *Alu* tous les 1kb dans les introns. Ce type de mutation pourrait donc être plus fréquent que ne le laisse penser la littérature.

Les mutations de type délétion/duplication intra-génique sont le plus souvent attribuées à un mécanisme de recombinaison homologue non-allélique par micro homologie entre séquences répétées (42).

L'existence d'une micro homologie parfaite de 25 paires de bases au niveau des points de cassure de la délétion des exons 15 et 16 semble incriminer ce mécanisme (Fig. 31)

La recombinaison homologue non-allélique (NAHR : Non Allelic Homologous Recombination) est reconnue comme un des principaux modèles pouvant expliquer les remaniements du génome humain. Elle survient pendant la méiose ou la mitose et nécessite deux répétitions segmentaires : low copy repeats ou LCR, éléments de type *Alu* ou LINE. Dans le cas présent, l'homologie parfaite de 25 paires de bases à l'intérieur de deux séquences *Alu*, présentant elles-mêmes un haut degré d'homologie, agissent comme substrats moléculaires de recombinaison. Ces séquences répétées, du fait de leur haut degré d'homologie, peuvent être alignées en méiose ou en mitose à la place des copies en position allélique habituelle, c'est le phénomène de mésappariement (43). Lorsque les séquences *Alu* sont situées sur le même chromosome et dans la même orientation, cela peut entraîner des duplications ou délétions (fig. 31).

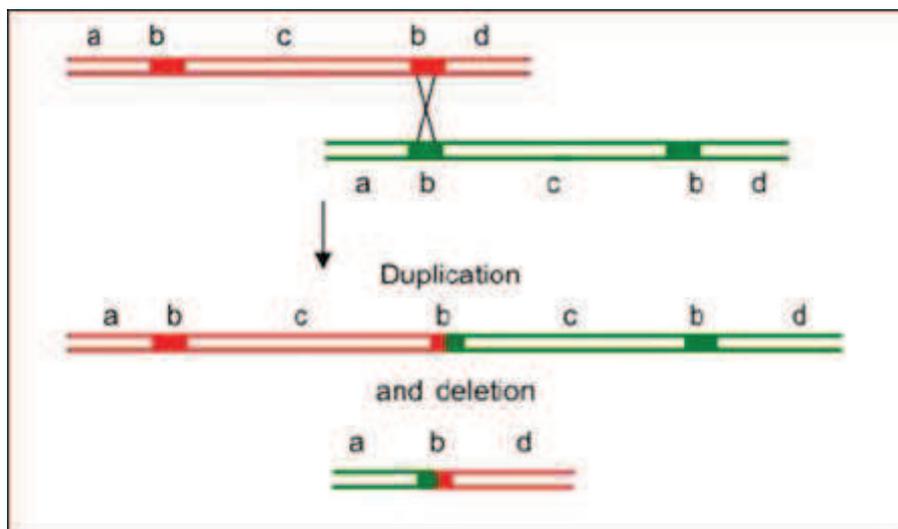


Figure 31. Schématisation du mécanisme NAHR, d'après Hasting *et al.* (42)

Le mécanisme de recombinaison homologue non allélique est le plus souvent en cause dans les remaniements récurrents. Concernant les remaniements non récurrents, la majorité des remaniements sont expliqués par les modèles de jonction d'extrémités non homologues (NHEJ : Non Homologous End Joining) ou celui d'interruption de la fourche de réplication et commutation de la matrice FosTeS (ForkStalling and Template Switching) (44). Il n'est donc pas exclu, du fait, notamment, qu'il s'agisse a priori de mutations non récurrentes, que les mécanismes de NHEJ ou de FosTeS soient impliqués.

Le mécanisme de NHEJ est un mécanisme de réparation de l'ADN qui permet de réparer des lésions provoquant des cassures double brin. Il ne permet pas de restaurer la séquence initiale de l'ADN mais permet de rétablir la continuité de l'ADN. Cette réparation entraîne le plus souvent une délétion, qui selon la localisation peut être silencieuse ou à l'origine d'une mutation (Fig. 32).

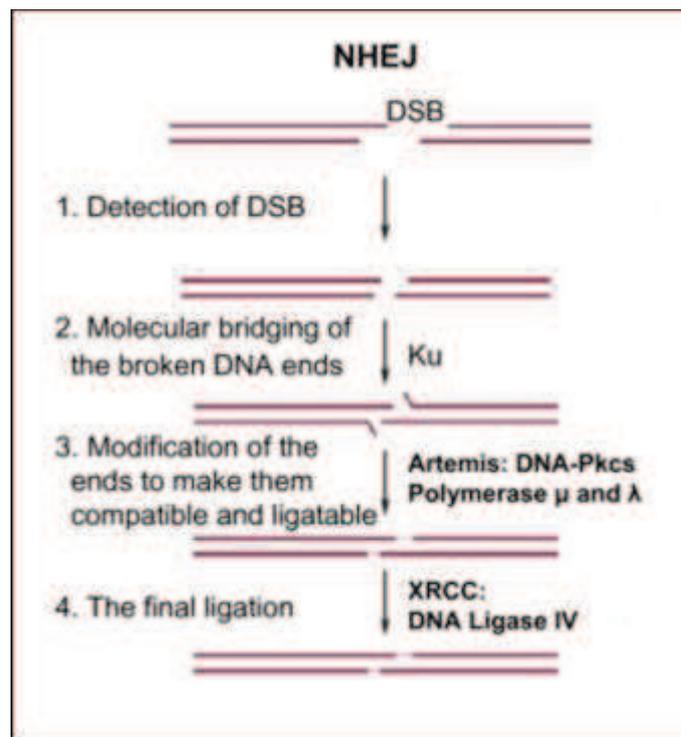


Figure 32. Schématisation du mécanisme NHEJ d'après Gu *et al.* (45).

Le mécanisme de FoSTeS est différent de la recombinaison homologue non-allélique et de la jonction d'extrémités non homologues, principalement parce qu'il s'agit d'une voie de

remaniement basée sur la réplication qui ne nécessite pas forcément la survenue d'une cassure double brin. Au niveau de la fourche de réplication, le brin retardé se dégage de la matrice d'origine et va chercher une séquence de micro homologie complémentaire avec son extrémité 3' (Fig. 33).

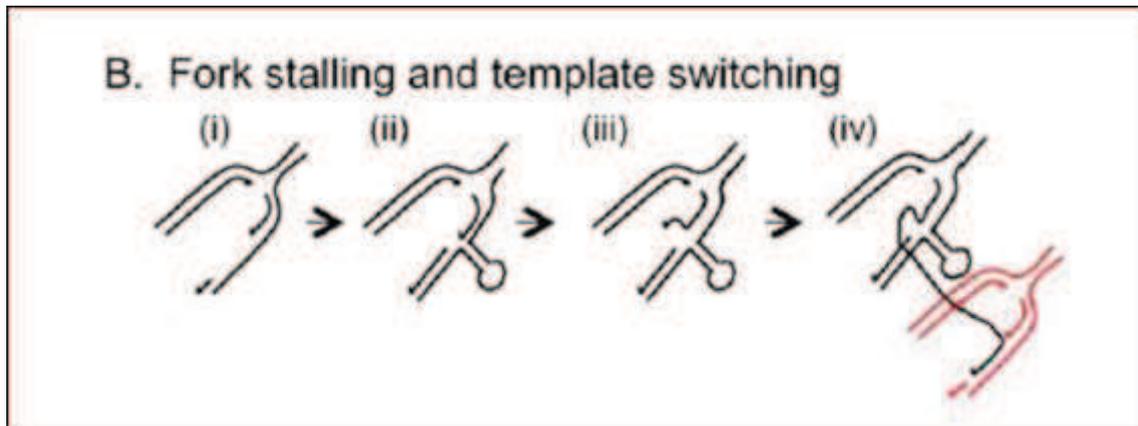


Figure 33. Schématisation du mécanisme de FosTeS, d'après Hasting *et al.* (42).

Les points de cassure de la délétion c.685_809del ; p.Leu229*, responsables de la délétion de l'exon 9, sont également localisés au sein de deux séquences *Alu*. Ces deux éléments présentent un fort taux d'homologie, mais nous n'avons pas retrouvé de micro homologie parfaite au point de jonction, ce qui ne nous permet pas de conclure sur le type de mécanisme en cause.

CONCLUSION

Nous avons mis en évidence trois nouvelles mutations dans le gène *TRIM37* dont deux sont de grands réarrangements génomiques non détectables par le séquençage de type Sanger. Il est donc essentiel de rechercher les réarrangements intra-géniques par des techniques de biologie moléculaire spécifiques, de type PCR semi-quantitative, lorsque le séquençage du gène *TRIM37* ne montre qu'une hétérozygotie, voir même une absence de variation de séquence. De par la richesse en séquences *Alu* (« points chauds » de mécanismes de recombinaison) dans les introns du gène *TRIM37*, il est donc important de rechercher ce type de mutation. L'existence de deux réarrangements différents chez nos patients laisse d'ailleurs supposer que ce type de mutation est plus fréquent que laissent penser les données de la littérature pour le gène *TRIM37*.

Ce travail nous a permis de montrer aussi l'existence de nouveaux génotypes hétérozygotes composites à l'origine du syndrome MULIBREY. Lorsque le nanisme MULIBREY est cliniquement diagnostiqué dans une famille d'origine non finlandaise, il nous paraît indispensable de compléter les analyses par des techniques modernes de génétique moléculaire. Ce d'autant que les mutations retrouvées chez les patients non finlandais sont de tous types et majoritairement privées.

Par ailleurs, nous avons montré l'importance de l'étude familiale dont le résultat peut orienter les stratégies d'analyses et le conseil génétique, en particulier dans le cas de pathologies autosomiques récessives comme l'est le nanisme MULIBREY

Enfin, il nous semble important d'évoquer le nanisme MULIBREY lorsque le phénotype est évocateur. En effet, la gravité des atteintes qui peuvent apparaître au cours de la vie (complications cardiaques et risque tumoral) souligne l'importance d'un diagnostic précoce. Pour cela, il est essentiel de réaliser une étude moléculaire complète chez ces patients afin d'assurer un suivi médical optimal. Cette analyse est d'autant plus importante que les syndromes souvent présentés comme diagnostics différentiels du nanisme

MULIBREY (en particulier le syndrome de Silver-Russell) ne sont eux pas associés à ce type de complications.

Afin de caractériser les fonctions de la protéine TRIM37, jusqu'alors peu connues, et les mécanismes pathogéniques sous-jacents à l'origine du nanisme MULIBREY, d'autres études de type fonctionnelles sont nécessaires.

REFERENCES

1. Karlberg, N. *et al.* (2004) MULIBREY nanism: clinical features and diagnostic criteria. *J. Med. Genet.*, **41**, 92–98.
2. Avela, K. *et al.* (2000) Gene encoding a new RING-B-box-Coiled-coil protein is mutated in MULIBREY nanism. *Nat. Genet.*, **25**, 298–301.
3. Kallijärvi, J. *et al.* (2002) The *TRIM37* gene encodes a peroxisomal RING-B-box-coiled-coil protein: classification of MULIBREY nanism as a new peroxisomal disorder. *Am. J. Hum. Genet.*, **70**, 1215–1228.
4. Kallijärvi, J. *et al.* (2005) *TRIM37* defective in MULIBREY nanism is a novel RING finger ubiquitin E3 ligase. *Exp. Cell Res.*, **308**, 146–155.
5. Kettunen, K.M. *et al.* (2016) *TRIM37*-deficient mice recapitulate several features of the multi-organ disorder MULIBREY nanism. *Biol. Open*, **5**, 584–595.
6. Perheentupa, J. *et al.* (1975) MULIBREY nanism: review of 23 cases of a new autosomal recessive syndrome. *Birth Defects Orig. Artic. Ser.*, **11**, 3–17.
7. Avela, K. *et al.* (1997) Assignment of the MULIBREY nanism gene to 17q by linkage and linkage-disequilibrium analysis. *Am. J. Hum. Genet.*, **60**, 896–902.
8. Reymond, A. *et al.* (2001) The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J.*, **20**, 2140–2151.
9. Karlberg, N. *et al.* (2007) Growth and growth hormone therapy in subjects with MULIBREY nanism. *Pediatrics*, **120**, e102-111.
10. Lapunzina, P. *et al.* (1995) MULIBREY nanism: three additional patients and a review of 39 patients. *Am. J. Med. Genet.*, **55**, 349–355.
11. Hämäläinen, R.H. *et al.* (2006) Wilms' tumor and novel *TRIM37* mutations in an Australian patient with MULIBREY nanism. *Clin. Genet.*, **70**, 473–479.
12. Seemanová, E. *et al.* (1999) MULIBREY nanism and Wilms tumor. *Am. J. Med. Genet.*, **85**, 76–78.
13. Christov, G. *et al.* (2013) Thoracoscopic pericardiectomy for constrictive pericarditis in a pediatric patient with MULIBREY nanism. *World J. Pediatr. Congenit. Heart Surg.*, **4**, 442–443.
14. Kumpf, M. *et al.* (2013) Refractory congestive heart failure following delayed pericardiectomy in a 12-year-old child with MULIBREY nanism due to a novel mutation in *TRIM37*. *Eur. J. Pediatr.*, **172**, 1415–1418.
15. Lipsanen-Nyman, M. *et al.* (2003) MULIBREY heart disease: clinical manifestations, long-term course, and results of pericardiectomy in a series of 49 patients born before 1985. *Circulation*, **107**, 2810–2815.
16. Eerola, A. *et al.* (2007) Cardiac dysfunction in children with MULIBREY nanism. *Pediatr. Cardiol.*, **28**, 155–162.
17. Similä, S. *et al.* (1980) A case of MULIBREY nanism with associated Wilms' tumor. *Clin. Genet.*, **17**, 29–30.
18. Karlberg, N. *et al.* (2009) High frequency of tumours in MULIBREY nanism. *J. Pathol.*, **218**, 163–171.
19. Karlberg, N. *et al.* (2005) Insulin resistance syndrome in subjects with mutated RING finger protein *TRIM37*. *Diabetes*, **54**, 3577–3581.
20. Karlberg, S. *et al.* (2004) Failure of sexual maturation in MULIBREY nanism. *N. Engl. J. Med.*, **351**, 2559–2560.

21. Kallijärvi, J. *et al.* (2006) Tissue expression of the MULIBREY nanism-associated TRIM37 protein in embryonic and adult mouse tissues. *Histochem. Cell Biol.*, **126**, 325–334.
22. Hämäläinen, R.H. *et al.* (2006) Characterisation of the MULIBREY nanism-associated TRIM37 gene: transcription initiation, promoter region and alternative splicing. *Gene*, **366**, 180–188.
23. Borden, K.L. (1998) RING fingers and B-boxes: zinc-binding protein-protein interaction domains. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.*, **76**, 351–358.
24. Meroni, G. *et al.* (2005) TRIM/RBCC, a novel class of “single protein RING finger” E3 ubiquitin ligases. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.*, **27**, 1147–1157.
25. Lehesjoki, A.E. *et al.* (2001) Expression of MUL, a gene encoding a novel RBCC family ring-finger protein, in human and mouse embryogenesis. *Mech. Dev.*, **108**, 221–225.
26. Bhatnagar, S. *et al.* (2014) TRIM37 is a new histone H2A ubiquitin ligase and breast cancer oncoprotein. *Nature*, **516**, 116–120.
27. Jagiello, P. *et al.* (2003) A novel splice site mutation in the TRIM37 gene causes MULIBREY nanism in a Turkish family with phenotypic heterogeneity. *Hum. Mutat.*, **21**, 630–635.
28. Hämäläinen, R.H. *et al.* (2004) Novel mutations in the TRIM37 gene in MULIBREY Nanism. *Hum. Mutat.*, **23**, 522.
29. Cumming, G.R. *et al.* (1976) Constrictive pericarditis with dwarfism in two siblings (MULIBREY nanism). *J. Pediatr.*, **88**, 569–572.
30. Thorén, C. (1973) So-called MULIBREY nanism with pericardial constriction. *Lancet Lond. Engl.*, **2**, 731.
31. Doğanc, T. *et al.* (2007) A novel mutation in TRIM37 is associated with MULIBREY nanism in a Turkish boy. *Clin. Dysmorphol.*, **16**, 173–176.
32. Wakeling, E.L. *et al.* (2016) Diagnosis and management of Silver-Russell syndrome: first international consensus statement. *Nat. Rev. Endocrinol.*, DOI: 10.1038/nrendo.2016.138.
33. Netchine, I. *et al.* (2007) 11p15 imprinting center region 1 loss of methylation is a common and specific cause of typical Russell-Silver syndrome: clinical scoring system and epigenetic-phenotypic correlations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **92**, 3148–3154.
34. Galaz-Montoya, C.I. *et al.*, (2014), Perfil clínico de una cohorte de pacientes con síndrome de Silver-Russell atendidos en el Hospital Infantil de México Federico Gómez de 1998 a 2012., **71**, 218–226.
35. Innes, A.M. *et al.* (1993) SHORT Syndrome. In *GeneReviews* (®) ((Pagon, R. A. *et al.*, Eds), University of Washington, Seattle.
36. Al-Dosari, M.S. *et al.* (2012) 3M syndrome: an easily recognizable yet underdiagnosed cause of proportionate short stature. *J. Pediatr.*, **161**, 139–145.e1.
37. Rowold, D.J. *et al.* (2000) *Alu* elements and the human genome. *Genetica*, **108**, 57–72.
38. Deininger, P.L. *et al.* (1999) *Alu* repeats and human disease. *Mol. Genet. Metab.*, **67**, 183–193.
39. Borck, G. *et al.* (2012) An *Alu* repeat-mediated genomic GCNT2 deletion underlies congenital cataracts and adult i blood group. *Hum. Genet.*, **131**, 209–216.
40. Boone, P.M. *et al.* (2014) The *Alu*-rich genomic architecture of SPAST predisposes to diverse and functionally distinct disease-associated CNV alleles. *Am. J. Hum. Genet.*, **95**, 143–161.
41. Reddy, R. *et al.* (2016) The genomic architecture of NLRP7 is *Alu* rich and predisposes to disease-associated large deletions. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG*, DOI: 10.1038/ejhg.2016.9.

42. Hastings, P.J. *et al.* (2009) Mechanisms of change in gene copy number. *Nat. Rev. Genet.*, **10**, 551–564.
43. Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale Types, fréquences et mécanismes de formation des anomalies chromosomiques. . [Online]. Available: http://campus.cerimes.fr/genetique-medicale/enseignement/genetique_19/site/html/1_11_115_1.html. [Accessed: 15-Aug-2016].
44. Ottaviani, D. *et al.* (2014) The role of microhomology in genomic structural variation. *Trends Genet. TIG*, **30**, 85–94.
45. Gu, W. *et al.* (2008) Mechanisms for human genomic rearrangements. *PathoGenetics*, **1**, 4.

ANNEXE I : PRIMERS

Sanger

Nom	Séquence	Nombre de bases	Tm en °C
N-1F	5' CGAGTCGCCAAGTCTCGTAT 3'	20	64.3
N-1R	5' TTTTATTGGGGAGTCOTG 3'	20	63.6
N-2F	5' TGAGCTGCTTTTACTCTTGA 3'	22	62.9
N-2R	5' TTGTAAGGATTAACCAATTCCTT 3'	24	63.3
N-3BSF	5' GTAATGATTTTTCTAATC 3'	19	65.4
N-3R	5' AGATCAGAAATGTGCTTGGG 3'	20	64
N-4F	5' TTGTCTCTCTATTTGAGAAAG 3'	24	63.3
N-4R	5' TCTTTCAGTCATGCGCTGT 3'	20	63.6
N-5F	5' AACTGACTCTTTTCCCAAG 3'	20	64
N-5R	5' GGCTAGAAAGGCACTGAATACTT 3'	23	61.5
N-6F	5' TGCAGATGAGATATGTAAAAGTG 3'	23	61.7
N-6R	5' TCAAGTTTCAAGATTTCAA 3'	22	63.3
N-7F	5' TGCTTCGTTTTAAAATTACCC 3'	24	61.1
N-7R	5' TGGTGCTTTCAGCTTCTTG 3'	20	63.1
N-8F	5' ACCAATATGAAACCAAGTG 3'	20	58.8
N-8R	5' TGTAAATGAAATAGCTTATCTTTT 3'	26	57.2
N-9F	5' AATTTGAGGTGGCAGTGAAT 3'	21	62.3
N-9R	5' TTGAAATTAATGTGAAATGCA 3'	22	61.6
N-10F	5' AGTGAAGCACTTGCCTTTT 3'	20	61.6
N-10BSF	5' TTTTGCCTTTTTTTTATG 3'	20	
N-10R	5' AGAGCCAGAAAGTATCTTTGG 3'	23	63.4
N-11F	5' CTTTTGCCTGTGCCATT 3'	20	63.8
N-11R	5' CCAAGGCTTCTTTCAGAGTTC 3'	23	62
N-12F	5' TCCATGCTTTCAGGCTTGA 3'	21	63.6
N-12R	5' AGATGCTTCCCTAGCA 3'	20	62.2
N-13F	5' GGGTATATCAATAAGGTTTCTTCA 3'	26	62.2
N-13R	5' TTGTGGGAAATAATATCATAGA 3'	24	62.9
N-14F	5' CCAAAATGCAGAATTCAGTG 3'	21	64.2
N-14R	5' TCCATGCTTTCAGCTTGTG 3'	21	62.8
N-15F	5' TTTACTGTCCAGTGAAGCTG 3'	21	65
N-15R	5' CAGTACATCATGGCTTTAACA 3'	23	62.8
N-16F	5' GGATGGGGTATCACTGAG 3'	20	64.4
N-16R	5' AAATGTAGGGATTCAGCACTTT 3'	24	60.7
N-17F	5' TTGAGGTGTGAAAAAAGG 3'	20	61.2
N-17R	5' TAGGTGGTAGCCACTGCTG 3'	20	62.9
N-18F	5' GAGATAGTCCATAGCAAGTATCA 3'	26	60.3
N-18R	5' TTTCACTATGTGTGGAACATG 3'	22	62.5
N-19F	5' TTGTTGATACCAGTAAAGCAC 3'	22	61.4
N-19R	5' CCAACGTTATTTGGAAACT 3'	21	62.5
N-20F	5' TTCCATGCAAGGTAAATAAAA 3'	23	61.2
N-20R	5' CCTGAAATGATGTTATCGTGG 3'	23	62.9
N-21F	5' TGACTCTGTGTTCAACCTC 3'	21	61.6
N-21R	5' TTTGAACTTAAATATGATCATG 3'	25	62.7
N-22F	5' TTTGTGCTCAGTCAAAAAAG 3'	22	63.5
N-22R	5' CAGGAAATGAGAAATCTGTCC 3'	22	63.6
N-23F	5' CGGAGATTTCTGTTCCTTT 3'	21	61
N-23R	5' ATACTAAAACCCCTCTGCC 3'	21	63.8
N-24F	5' GGAAAGAAAATCTGCCCTGT 3'	22	64.1
N-24R	5' ACCTTACCTGAAATTTTC 3'	20	62.8
N-25F	5' AAGCACTTTGGACTATAATGTGACC 3'	26	62.1
N-25R	5' CTGTATCCAAAATATGCCAG 3'	21	60.8

QFM-PCR

Exon	Taille amplicon	Séquence primer	Tm	Nb bases
Exon 1	156	CGCCTAAGAGGTCAGACTGC	60,1	20
Exon 2	166	GCTGAGGTTTTCCGATGTTT	59,2	20
Exon 3	123	TAATCTTTTGCCCCCTTAGC	58,3	20
Exon 4	232	ATTGTCGTTGGGCAGAAGAA	60,6	20
Exon 5	225	GCCCAAGCTTAAGAATTTGTG	59,8	21
Exon 6	237	GCATGGCGGACATACCTTTA	60,9	20
Exon 7	151	AAATGCAAAAGATGAGCGTGT	59,8	21
Exon 8	100	ATCTCTAACCCAAGAAACAGAGC	58	23
Exon 9	184	CACACAGTTGCGGCTTGTGA	58,3	20
Exon 10	114	GTGCCATCTTACGATTACAGC	58,3	20
Exon 11	167	GGGATTTGGTTGGTTTTCTT	57,8	20
Exon 12	130	AATGGAGTTGTGCGAGGTTA	58,2	20
Exon 13	175	CGAGAATTTGCATCTGACTTTG	59,9	22
Exon 14	107	TCAGTTGGAAGCTGCACAG	60,7	19
Exon 15	217	CCCCAAAATGATGATGCTCT	59,9	20
Exon 16	189	CACGAGCTTTCAGATGGAGA	59,1	20
Exon 17	106	AGGACCCGCAGGTAATGAG	60	19
Exon 18	173	CCTTAAGACCCGAGCAGTA	59,3	20
Exon 19	195	GCTTCTGGAGACATGCAGAC	58,5	20
Exon 20	207	TTGCAGCCACAATAAGAAGA	58,6	21
Exon 21	109	CGGTTGAGAAAAGGAGGAAA	59,3	20
Exon 22	153	AGGTCATCTGGAAGACTGC	59,3	20
Exon 23	163	TGAGTAGCGACAGTGACATTGA	59,5	22
Exon 24	126	TCCAGTTTTCTGATGGTGA	59	20
Exon 25	214	ATAGTTGGGCCATGTTGAC	59,7	20

Points de cassure

intron	Séquence Primers
TRIM37-INT8-F1	AACACACATACTGCCTGCT
TRIM37-INT8-F2	TGACAAAAATGCAGCTGTTGT
TRIM37-INT8-F3	ACGGGTGTATGTGTACGT
TRIM37-INT9-R1	TGATTCTCAGTCAGGGGTGA
TRIM37-INT9-R2	GCCTGTGATTAAGTGTATAGCT

ANNEXE II : PROTOCOLES

1) Sanger

Amplification des exons 2 à 25

Mix pour un échantillon

25 µL de Taq Qiagen Multiplex PCR Master Mix 2x à 5unités/µL

0.2 µL de primer F à 100 pmol/µL

0.2 µL de primer R à 100 pmol/µL

23.6 µL d'eau

Réaction avec 49 µL de mix et 350 ng/UI d'ADN.

Amplification de l'exon 3

Programme PCR : NAN-50

95 °C 10 minutes

95 °C 45 secondes }
50 °C 45 secondes } 30 cycles

72 °C 45 secondes }

72 °C 5 minutes

4 °C for ever

Amplification de l'exon 9

Programme PCR : NAN-60

95 °C 10 minutes

95 °C 45 secondes }
60 °C 45 secondes } 30 cycles

72 °C 45 secondes }

72 °C 5 minutes

4 °C for ever

Amplification de l'exon 1

Mix pour un échantillon

25 µL de Taq Qiagen Multiplex PCR Master Mix 2x à 5unités/µL

0.2 µL de primer F à 100 pmol/µL

0.2 µL de primer R à 100 pmol/µL

2.5 µL de DMSO pur (vf=50 µL, cf= 5%)

23.6 µL d'eau

Réaction avec 49 µL de mix et 350 ng/UI d'ADN.

Amplification de l'exon 8

Programme PCR : NAN-58

95 °C 10 minutes

95 °C 45 secondes

58 °C 45 secondes

72 °C 45 secondes

72 °C 5 minutes

4 °C for ever

Amplification 1, 2, 4>7, 10>25

Programme PCR : NAN-62

95 °C 10 minutes

95 °C 45 secondes

62 °C 45 secondes

72 °C 45 secondes

72 °C 5 minutes

4 °C for ever

Electrophorèse de vérification

Gel d'agarose à 2 %

7 µL de Ficoll Orange G + 5 µL d'ADN amplifié

Réaction de séquence exons 1 et 14

Mix pour un échantillon

2 µL RR v.1.1

4 µL tampon

0.33 µL primers F ou R à 10 pmol/µL

0.67 µL d'eau

Réaction de séquence exon 18R

(si problème avec le mix « standard »)

Mix pour un échantillon

2 µL RR v.1.1

3 µL tampon

0.33 µL primers F ou R à 10 pmol/µL

0.67 µL d'eau

1 µL dNTP à 2.5 Mm

Exons 3 et 10

Programme PCR : programme no-hybrid

96 °C 1 minute

96 °C 10 secondes

50 °C 5 secondes

60 °C 4 minutes

4 °C for ever

25 cycles

Réaction de séquence exon 10

Mix pour un échantillon

2 µL RR v.1.1

4 µL tampon

0.33 µL primers F ou R à 10 pmol/µL

0.67 µL d'eau

Réaction de séquence « standard »

Exons 2>9, 11>13, 15>25

Mix pour un échantillon

2 µL RR v.1.1

4 µL tampon

0.33 µL F ou R à 10 pmol/µL

0.67 µL d'eau

Autres exons (1, 2, 4>9, 11>25)

Programme PCR : programme séquence

96 °C 1 minute

96 °C 10 secondes

60 °C 4 minutes

4 °C for ever

2) QFM-PCR

Dilution des amorces à 20 pmol

Dilution des ADN à 50 ng/μL

Mix standard pour la QFM-PCR (pour 1) :

Qiagen Multiplex PCR Master Mix 2x : 12.5 μL

F contrôle à 20 pmol : 1 μL

R contrôle à 20 pmol : 1 μL

F exon étudié à 20 pmol : 1 μL

R exon étudié à 20 pmol : 1 μL

H₂O : QSP 24 μL

24μL Mix + 1μL ADN (dilué à 50 ng/μL)

Programme thermocycleur :

Pré PCR : 98° 10 min

PCR : 95° 45 sec
60° : 45 sec
72° : 30 sec

} 24 cycles

Elongation terminale : 72° : 5 min

37 ° : 1 min

Purification de PCR : cf protocole fournisseur

Préparation migration séquenceur : (pour 1)

Formamide : 9 μL ou Formamide : 11 μL

Lis 600 : 2μL ROX 500 : 0.5 μL

+ 1 μL de PCR purifiée

Dénaturation : (programmée sur thermocycleur) : 3 minutes à 95°

Migration sur le séquenceur : Create new plate: application : GeneMapper-Generic

3) Q PCR

Mix standard pour la QPCR (pour 1) :

Qiagen Multiplex PCR Master Mix 2x : 10 μ L

Primer F : 0,2 μ L

Primer R : 0,2 μ L

MgCl : 2 μ L

H₂O : 7,6 μ L

20 μ L Mix + 1 μ L ADN

Programme LightCycler :

Pré PCR : 95° 1 min

PCR : 95° : 10 sec
60° : 30 sec
72° : 30 sec

} 65 cycles

Elongation terminale : 72° : 5 min

37 ° : 1 min

ANNEXE III : SERMENT D'HIPPOCRATE

Au moment d'être admis à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous les éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré et méprisé si j'y manque.

Les mutations du gène *TRIM37* dans le nanisme MULIBREY non Finlandais

RESUME

Introduction : Le nanisme MULIBREY (MUL; OMIM 253250) est une maladie génétique rare. A ce jour, environ 135 cas ont été rapportés dans la littérature. Parmi eux, une vingtaine ne sont pas d'origine Finlandaise, ces cas présentent des mutations privées du gène tripartite motif-containing protein 37 (*TRIM37* #OMIM 605073). Le nanisme MULIBREY est caractérisé par une dysmorphologie faciale, un retard de croissance, et une atteinte multi-organes. Des complications, cardiaques ou tumorales, peuvent engager le pronostic vital. Nous rapportons 3 cas présentant un nanisme MULIBREY clinique chez qui nous avons étudié le gène *TRIM37*.

Matériel et méthode : Nous avons réalisé un séquençage et une recherche de grands réarrangements par PCR multiplex semi-quantitative amplifiant de courts fragments fluorescents et par PCR temps-réel semi-quantitative du gène *TRIM37* chez nos 3 patients.

Résultats : Trois nouvelles mutations ont été mises en évidence : la mutation p.Arg61*, la délétion des exons 15 et 16 p.Leu229* et de l'exon 9 p.Leu229*.

Discussion : Il est important de rechercher un nanisme MULIBREY chez un patient présentant un phénotype de syndrome de Silver-Russell non confirmé en raison de leur ressemblance clinique. Nos résultats suggèrent l'implication d'un mécanisme de recombinaison homologue non allélique médié par des séquences *Alu* comme cause possible de la survenue de grandes délétions.

Conclusion : Un diagnostic précoce du nanisme MULIBREY est nécessaire du fait de la gravité des complications. Ce travail propose une nouvelle stratégie d'investigation moléculaire pour l'étude du gène *TRIM37* afin de rechercher un réarrangement complexe non mis en évidence par le séquençage.

Mots clés : nanisme MULIBREY, nanisme, Protéine TRIM37 humain, Syndrome de Silver-Russell, péricardite constrictive, PCR multiplex, Éléments *Alu*.

TRIM37 mutations in non-Finnish MULIBREY nanism

RESUME

Introduction: MULIBREY (MUScle, LIver, BRain, EYE) nanism (MUL; OMIM 253250) is a rare autosomal recessive inherited disease caused by mutations of *TRIM37* gene. High frequency of Finnish MUL patients is due to the prevalence of two main mutations with local founder effect. In contrast, non-Finnish patients reported have private mutations. MULIBREY is characterized by pre and post-natal growth failure and distinctive facial dysmorphism, and multi-organ damages. Two other recurrent features are important for the disease's prognosis: tumor predisposition and cardiac involvement. We studied the *TRIM37* gene in three patients fulfilling the clinical criteria of MULIBREY nanism.

Patients and Methods: We sequenced the *TRIM37* gene and performed a multiplex PCR technique amplifying short fluorescent fragments in all affected members and their parents.

Results: we could identify a new missense mutation p.Arg61* and 2 new deletions p.Leu229*. Leading to the absence of exon 15 and exon.16 and p.Leu229* leading to the absence of exon 9.

Discussion: It is important to think of MULIBREY nanism in a patient with Silver-Russell syndrome phenotype without molecular confirmation, due to the overlapping phenotypic picture. Our data suggest the involvement of an *Alu* core sequence-stimulated non-allelic recombination as a possible cause for this deletions.

Conclusions: The severity of cardiac or tumor complication emphasized the necessity of precociously diagnose MULIBREY nanism. This report illustrates a new strategy to investigate for *TRIM37* mutations and underlines the importance of searching for complex rearrangement when one allele only is found mutated by using direct sequencing.

Keywords: MULIBREY nanism, dwarfism, TRIM37 protein human, Silver-Russell Syndrom, constrictive pericaditis, Multiplex PCR, *Alu* Element.